

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

ADARA BARBOSA DE SOUSA

**Proficiência de tumores de ovário quanto ao sistema de reparo de
pareamento incorreto de DNA**

RIBEIRÃO PRETO

2021

ADARA BARBOSA DE SOUSA

**Proficiência de tumores de ovário quanto ao 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

2021

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

Ficha catalográfica

Sousa, Adara Barbosa

Título - Proficiência de tumores de ovário quanto ao sistema de reparo de pareamento incorreto de DNA. Ribeirão Preto, 2020.

113 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Evangelista de Faria Ferraz, Victor.

1. Câncer. 2. Reparo de mal pareamento. 3. Síndrome de Lynch.

FICHA DE APROVAÇÃO

Nome: SOUSA, Adara Barbosa de. Título: Proficiência de tumores de ovário quanto ao 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: _____

Apoio e suporte financeiro

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento de Pesquisa (CNPq), da Fundação de Amparo ao Ensino Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

Aos meus pais, por muito; mas em especial, por com honestidade e dignidade me fornecerem um tesouro: os estudos! Assim, vocês me impulsionam em busca dos meus sonhos. Sonhos tais que embora vocês também tenham sonhado para si, sei que não foram possíveis, e em mim, vocês se realizam. À dona Jaqueline e seu Antônio, como também a muitos pais e filhos de origem humilde, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Acredito que nos agradecimentos há uma licença onde se pode florescer toda a personalidade do autor. Logo, não pouparei minhas melhores palavras nem páginas em gratidão por aqueles que estiveram comigo ao longo desta longa caminhada!

“Que darei eu ao Senhor, por todos os benefícios que me tem feito?”. Isto diz o salmista Davi, no 116º Salmo da Bíblia Sagrada. Me pergunto isso todos os dias, pois é dEle que vem tanto o querer quanto o realizar deste grande feito em minha vida. Logo, ao Autor e Consumador da minha fé, eu agradeço imensamente e rendo toda a honra e glória! Este mestrado foi um sonho nutrido em secreto por muitos meses até a aprovação; regado à lágrimas do começo ao fim e embalado por orações que me fizeram vivenciar o que talvez até então eu não entendia que fosse a Fé.

Aos meus pais, pois reconheço as inúmeras renúncias para que eu chegasse até aqui e esta conquista não é só minha, é nossa! Costumo os ver como aves, que depenaram das suas asas para que eu pudesse ser capaz de voar com as minhas próprias e ser a profissional e ser humano que hoje sou. Gostaria dar evidência a garra da minha mãe, que aos quase 50 anos de vida, pode dizer que fez muita faxina na vida mas hoje é uma enfermeira concursada federal. Me sinto no dever de registrar isso aqui para que todos saibam que você é forte e guerreira e seu exemplo me inspira a nunca desistir. Não distante, quero que todos saibam da humildade de meu pai, porque cada coco seco vendido na feira pagou os meus estudos, as minhas passagens, o meu lanche e forjou o meu caráter. Sinto uma saudade do senhor que não cabe dentro do peito! Sinto um orgulho imenso de ter o pai e a mãe que eu tenho e, se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes! Obrigada imensamente por tudo que fizeram e fazem por mim, não só neste plano terreno, mas também pelas batalhas travadas em oração pela minha vida, porque isso também foi essencial para que eu permanecesse de pé e chegasse até o dia de hoje.

À minha irmã, registro agradecimento e um pedido de perdão. Eu sei que quem mais sentiu a minha ausência foi você, e eu lhe peço perdão, minha querida, por ter lhe feito chorar. Athina, me desculpe por não ter sido o abraço, o colo nem muitas vezes a pronta ajuda a cada atividade do colégio. Eu sei que você precisou muito de mim ao longo de todo esse tempo. Me perdoe por tudo, mas registro aqui o quanto lhe amo e o quanto pensar em você me fortalece. Eu não quero jamais que você seja igual a mim, mas espero que ao me olhar, você sinta ao menos que posso ser um exemplo que pode ser seguido. Te amo infinito e sim, eu também sinto falta do seu cheirinho, meu eterno bebê!

À minha avó, minhas tias, tios e primos, obrigada por suas orações/preces e por sempre lembrarem de mim. Mas em especial a você, Lúcio, meu tio, registro agradecimentos, hoje infelizmente in *memorian*. Sei que se estivesse aqui sentiria imensa alegria por esse momento como se eu fosse a menininha que você sempre quis ter e que você sempre teve em amor como tal. O câncer não te venceu, apenas te levou mais cedo para o nosso Eterno Lar e me fortaleceu a ver não a doença, mas cada caso com singularidade, com uma história, com uma família, com amor.

Ao meu futuro esposo, Daniel, louvo a Deus por sua vida, por ser tão incrível e bondoso comigo, e por ter vivido toda a intensidade do mestrado ao meu lado. Dividir o fardo ao longo desses dois anos com você fez essa caminhada possível. Um dia contaremos aos nossos filhos as muitas bênçãos que o Senhor nos deu, mas certamente você me é será sempre a maior delas! Nesse pacote família, gostaria de agradecer a André e Daniela, meus sogros, por tanto amor. Muito obrigada, André, por ser tão paciente e cuidadoso comigo, por cada abraço paterno no qual me sinto protegida e acolhida como se eu tivesse nos braços de meu pai. Minha querida Daniela, amo seu jeito atrapalhado mas que foi certa em ser cupido meu e de Daniel! Obrigada por seu amor de mãe que só sossega agora quando tem todos debaixo das asas.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz, sou grata por toda a paciência e por ser tão bom orientador quanto eu poderia ter. Obrigada por sua empatia, pela construção de conhecimento até aqui vivenciada, obrigada por acreditar em mim quando eu mesma não acreditava, tenha feito o senhor isso de modo intuitivo ou intencional, isso me motivou muito. Gratidão, professor!

Aos meus colegas de núcleo de pesquisa, Reginaldo e Jéssica, por toda a paciência e pelos bons momentos que vivemos. Muito obrigada, Reginaldo, por toda a ajuda desde o curso de verão, com as minhas amostras, análises... Tu és um ser humano lindo, merece tudo de bom! Voa bem longe, menino! Jéssica, à você também, agradeço por toda a paciência e pelos desabafos que fizemos por muitas vezes uma com a outra. Você é forte, competente e te desejo tudo o que há de melhor.

Aos meus amigos que estão na Paraíba, agradeço de um tanto que nem sei dimensionar. Laryssa, Letícia e Emillyn, você são a minha infância e adolescência que permanece para a vida. Obrigada por tanto, pela festa de despedida, por terem sido os meus últimos abraços quando saí de casa. A cena do tchau, na porta de minha casa junto com meus pais no dia que parti me deu o significado de que família também é aquilo que construímos. Bruna era a pessoa que me levava dentro do carro naquele dia. Obrigada

minha amiga, por esse gesto imenso de cuidado e serviço. Obrigada por ser uma amiga presente e obrigada pelo presente que é Noah em minha vida. Agradeço a Lidiane, minha amiga, ex-coorientadora e parceira para a vida por toda a ajuda que me dá até hoje. Em especial, obrigada pelo auxílio com as análises estatísticas deste trabalho. O que seria de mim sem tu? Obrigada Sonaly e Karen, por serem o significado de amigas e irmãs em Cristo em minha vida, com quem posso dividir todas as minhas conquistas e angústias expondo não só emoções, mas aquilo que há em minha alma. À Thalita, por ter me acolhido quando cheguei em Ribeirão Preto pela primeira vez sem nem saber que esta cidade seria meu lar por alguns anos. Aliás, obrigada por sempre me acolher. Quando penso em você, penso em cheirinho de cuscuz e café coado pela casa. Obrigada por ser meu pedacinho de Nordeste aqui.

À Beth, Anderson, Mayanne, Ronnie, Joeliton, Mara Lígia, Keith e família, Rízia e família, Amanda e família, Rosane e família; aos professores Dr. André Pessanha e Dr. Walclécio Lira, que mesmo de longe sempre torcem por mim. À Thiago, Fábio, Isabella, Camilla e Amanda, amados colegas que esse período de mestrado me concedeu. Obrigada por toda a ajuda sempre que precisei. Em especial a Isabella, por sempre ser um ombro amigo. Aos amados irmãos que a Igreja Presbiteriana de Ribeirão Preto me deu. Todos, mas em especial à Lara, Mickael, Douglas, Luciana, Juliana Souza e Juliana Borges. Às queridas companheiras em Barretos, nos novos rumos que tomei: Raquel, Joyce e Paula, obrigada por todo o apoio.

Agradeço aos professores Dr. Fernando Chahud, e a Dra. Mariângela Ottoboni Brunaldi, docentes do Departamento de Patologia da FMRP/USP, por toda a disponibilidade e prontidão de sempre e às dúvidas sanadas. Ao Dr. Alfredo Ribeiro Silva, também docente do Departamento de Patologia da FMRP/USP, pelo auxílio na parte experimental do trabalho e a estrutura de seu laboratório que me foi disponibilizada. Registro agradecimentos as queridas Laura e a Marcia, técnicas do laboratório do Dr. Alfredo, pelo auxílio em uma parte experimental deste trabalho.

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética por todo o suporte e infraestrutura. Agradeço especialmente à Susie Adriana Ribeiro Penha Nalon, na prontidão de sempre em me ajudar e sanar minhas dúvidas. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos; à 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), à Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro utilizado para a execução deste trabalho.

Aos professores que, ao longo de todos esses anos fizeram parte de minha caminhada acadêmica e contribuíram para minha formação como ser humano e profissional, agradeço imensamente.

A todas as técnicas do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental (FMRP/USP), em nome do Prof. Dr. Wilson Marques, por terem me ajudado tanto não só na parte de bancada mas sempre que possível em um pouco mais. Em especial, à Sandra e à Daiana, amáveis pessoas, por terem me ensinado com toda a paciência como eu poderia melhor realizar meu trabalho, por sempre me acalmarem e estarem comigo ao longo dessa caminhada. Agradeço à equipe do Centro de Medicina Genômica, em nome do Prof. Dr. Wilson Araújo, por todo o carinho e auxílio. Em especial à Meire, Karla, Márcia, Geni, Marinez, Anne e Camila, por serem sempre muito gentis. A toda equipe do Serviço de Genética Médica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto agradeço por toda a prestatividade.

À todos aqueles que de modo direto ou indireto me auxiliaram na caminhada e conclusão deste trabalho, o meu muito obrigada!

“Depois que cumprimos nossa função, somos descartados. Mas os genes são para sempre.”

Richard Dawkins, livro: O Gene Egoísta.

RESUMO

SOUSA, Adara Barbosa de. **Proficiência de tumores de ovário quanto ao sistema de reparo de pareamento incorreto de DNA**. 2021. Dissertação (Mestrado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O câncer de ovário (CO) é a neoplasia do sistema ginecológico com o mais alto índice de mortalidade. Quanto a predisposição genética ao desenvolvimento do câncer, a Síndrome de Lynch (SL) corresponde a segunda manifestação sindrômica mais importante associada ao desenvolvimento de neoplasias epiteliais de ovário. Os tumores desenvolvidos por portadores da SL são deficientes do sistema de reparo de pareamento incorreto de DNA (MMR), sendo esta característica detectada pela ausência de expressão de pelo menos uma das quatro principais proteínas deste sistema de reparo de DNA (a saber: MLH1, PMS2, MSH6 e MSH2) e/ou um perfil alélico alterado em *loci* de microssatélites, culminando no fenótipo tumoral da instabilidade de microssatélites. A estratégia de triagem universal dos tumores maximiza o diagnóstico de pacientes potencialmente portadoras da síndrome de Lynch, em especial quando acometidos por cânceres fora do espectro comum da síndrome, promovendo uma melhor intervenção terapêutica e aconselhamento genético pessoal e familiar. Isto posto, o objetivo deste trabalho centrou-se em caracterizar tumores epiteliais de ovário quanto à proficiência do sistema de reparo MMR em uma casuística brasileira não selecionada. Um total de 75 casos de câncer de ovário de origem epitelial perfazem o N amostral deste estudo, onde destes 1,33% (1/75) possui perda de expressão concomitante de *MSH2/MSH6* pela IHQ. Esta é a primeira casuística brasileira a investigar a associação do sistema de reparo de pareamento incorreto de DNA à neoplasias epiteliais de ovário. Os resultados não suportam a triagem universal para os casos de neoplasias epiteliais de ovário devido à baixa frequência mas, ressaltamos a importância de investigação para os casos de tumores ovarianos não serosos e não mucinosos sempre que possível para hábil identificação de tumores deficientes no sistema MMR e para o potencial diagnóstico de SL, permitindo a devida prestação de saúde e vigilância.

Palavras chaves: Câncer. Reparo de mal pareamento. Síndrome de Lynch.

ABSTRACT

SOUSA, Adara Barbosa de. **Proficiency of Ovarian Tumors regarding DNA Mismatch Repair System.** 2021. Dissertation (Master's degree in Genetics) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Ovarian cancer (OC) is a neoplasm of the gynecological system with the highest mortality rate. As for the genetic predisposition to cancer development, Lynch Syndrome (LS) is the second most important syndromic manifestation associated with the development of epithelial ovarian neoplasms. Tumors developed by LS carriers are deficient in the DNA mismatch repair system (MMR), this characteristic being detected by the absence of expression of at least one of the four main proteins of this DNA repair system (namely: MLH1, PMS2, MSH6 and MSH2) and/or an altered allelic profile at microsatellite loci, culminating in the tumor phenotype of microsatellite instability. The universal screening strategy for tumors maximizes the diagnosis of patients potentially carrying Lynch syndrome, especially when affected by cancers outside the common spectrum of the syndrome, promoting better therapeutic intervention as well as personal and family genetic counseling. That said, the aim of this study was to characterize ovarian epithelial tumors regarding the proficiency of the MMR repair system in an unselected Brazilian series. A total of 75 cases of epithelial ovarian cancer make up the N sampling in this study, where 1.33% (1/75) of these have concomitant loss of MSH2/MSH6 expression by IHC. This is the first Brazilian series to investigate the association of the DNA mismatch repair system to ovarian epithelial neoplasms. The results do not support the universal screening for cases of epithelial ovarian neoplasms due to their low frequency, but we emphasize the importance of investigating cases of non-serous and non-mucinous ovarian tumors whenever possible for able identification of deficient tumors in the MMR system and for the potential diagnosis of LS, allowing the proper provision of health and surveillance.

Keywords: Cancer, Mismatch Repair, Lynch Syndrome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Construção dos blocos de microarranjos teciduais.....	56
Figura 2 -	Fluxograma das etapas metodológicas.....	66
Figura 3 -	Contribuição dos subtipos histológicos na formação dos grupos de estadiamento tumoral grau FIGO.....	70
Figura 4 -	Reações de imuno-histoquímica das proteínas MSH2, MSH6, MLH1 e PMS2 em cortes histológicos de câncer epitelial de ovário.....	71
Figura 5 -	Eletroferogramas referentes às análises de instabilidade de microssatélites em amostras de tumores epiteliais de ovário.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Critérios de Amsterdam I.....	42
Tabela 2 -	Critérios de Amsterdam II.....	42
Tabela 3 -	Diretrizes de Bethesda.....	44
Tabela 4 -	Diretrizes de Bethesda revisadas.....	44
Tabela 5 -	Critérios da Sociedade de Oncologia Ginecológica sobre a avaliação de risco para predisposições herdadas ao câncer ginecológico.....	45
Tabela 6 -	Anticorpos primários utilizados nas reações de imuno-histoquímica.....	60
Tabela 7 -	Características dos marcadores microssatélites e dos respectivos <i>primers</i> utilizados para geração dos <i>amplicons</i>	62
Tabela 8 -	Descrição dos reagentes utilizados nas reações de PCR multiplex.....	62
Tabela 9 -	Programa de ciclagem utilizada para obtenção dos <i>amplicons</i> por PCR multiplex.....	63
Tabela 10 -	<i>Primers</i> utilizados para análise de metilação do promotor do gene <i>MLH1</i>	64
Tabela 11 -	Descrição dos reagentes utilizados nas reações de MSP-PCR.....	65
Tabela 12 -	Programa de ciclagem utilizada para obtenção dos amplicons pela técnica de MSP-PCR.....	65
Tabela 13 -	Características clínico-patológicas da casuística.....	68
Tabela 14 -	Subtipos histológicos dos tumores epiteliais de ovário da casuística.....	69
Tabela 15 -	Definição da instabilidade de microssatélite através do QMRV.....	73
Tabela 16 -	Resultados descritivos de IHQ, MSI e o status de proficiência do sistema MMR para cada tumor.....	75
Tabela 17 -	Frequência observada do teste de Qui-quadrado entre as amostras viáveis e não viáveis de 2008 a 2018.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	do inglês, <i>Adenosine Triphosphate</i>
CO	Câncer de Ovário
dMMR	Tumores de Ovário Deficientes da Atividade do Sistema MMR
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DNA	do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</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
HBOC	do inglês – <i>Hereditary Breast and Ovarian Cancer</i>
HCRP	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
HNPCC	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 Baixa
MSP	PCR específico para análise de metilação
MSS	Estabilidade de Microssatélites
NOS	do inglês, <i>Non-specific Adenocarcinoma</i>
PCNA	do inglês, <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pMMR	Tumores de Ovário 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
TMA	do inglês, <i>Tissue Micro-Array</i>
TCLE	Termo De Consentimento Livre e Esclarecido

USP

Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Câncer epitelial de ovário.....	20
1.1.1 Epidemiologia.....	21
1.1.2 Classificação dos tumores epiteliais de ovário.....	20
1.1.3 Patogênese.....	22
1.2. Fatores de risco e protetivos.....	24
1.2.1 Reprodutivos e hormonais.....	24
1.2.2 Relacionados ao estilo de vida.....	26
1.2.3 Fatores ginecológicos.....	27
1.2.4 Associação controversa.....	29
1.2.5 Fatores genéticos.....	30
1.3 Síndrome de Lynch.....	31
1.3.1 Histórico.....	32
1.3.2 Etiologia.....	35
1.3.2.1 Mecanismos genéticos na patogênese da Síndrome de Lynch.....	35
1.3.2.2 Mecanismos epigenéticos na patogênese da Síndrome de Lynch.....	36
1.3.3.3 Sistema de reparo de pareamento incorreto de DNA (MMR).....	37
1.3.3.4 Fenótipo.....	40
1.4 Abordagem diagnóstica.....	41
1.4.1 Critérios clínicos e patológicos.....	41
1.4.2 Triagem universal dos tumores.....	46
1.4.3 Imuno-histoquímica.....	47
1.4.4 Instabilidade de microssatélites.....	49
1.4.5 Análise de metilação da região promotora de MLH1.....	51
2. JUSTIFICATIVA.....	53
3. OBJETIVOS.....	54
3.1 Objetivos gerais.....	54
3.2 Objetivos específicos.....	54
4. MATERIAS E MÉTODOS.....	55
4.1 Casuística.....	55
4.2 Aspectos éticos.....	55
4.3 Caracterização clínico patológica.....	55
4.4 Caracterização molecular da proficiência do sistema MMR.....	55

4.4.1	Análise de expressão das proteínas do MMR.....	55
4.4.2	Extração de DNA.....	61
4.4.3	Instabilidade de microssatélites.....	62
4.4.4	Metilação da região promotora do gene <i>MLH1</i>	64
4.5	Classificação molecular dos tumores	65
4.6	Fluxograma das etapas metodológicas.....	66
4.7	Análise estatística.....	67
5.	RESULTADOS.....	68
5.1	Caracterização clínico-patológica da casuística.....	68
5.2	Caracterização molecular da casuística.....	70
5.2.1	Imuno-histoquímica.....	70
5.2.2.	Instabilidade de microssatélite.....	71
5.2.3	Análise de metilação.....	77
6.	DISCUSSÃO.....	78
7.	CONCLUSÕES.....	90
	REFERÊNCIAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer epitelial de ovário

Os ovários são órgãos pélvicos pares pertencentes ao sistema reprodutor feminino, cujas principais funções residem na síntese de importantes hormônios sexuais – estrogênio e progesterona – e o armazenamento dos ovócitos. Essas duas funções são chamadas também de esteroidogênese e oogênese, respectivamente. As neoplasias ovarianas podem ter como origem diferentes células da constituição ovariana mas, os tumores epiteliais de ovário constituem a ampla maioria, representando aproximadamente 90% dos casos (BARNES et al., 2021).

1.1.1 Epidemiologia

De acordo com estimativas realizadas pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês – *International Agency for Research on Cancer*), em 2018 ocorreram cerca de 295.414 mil novos casos de neoplasias ovarianas em todo o mundo, ocupando este a oitava posição no ranking de neoplasias que acometem as mulheres em todo o mundo (IARC, 2020). Estes mesmos dados, endossados pelas estimativas da Sociedade Americana do Câncer para o ano de 2020, revelam que potencialmente seis em cada dez mulheres acometidas por câncer de ovário vem á óbito (SGO, 2014). Este alto índice de letalidade está relacionado principalmente a progressão tumoral sem sintomatologia inicial, que por sua vez leva a um diagnóstico tardio, constituindo-o em termos epidemiológicos como a segunda neoplasia ginecológica mais incidente e aquela com o mais alto índice de letalidade.

Quanto a distribuição global dos casos, as maiores taxas de incidência são observadas nos países europeus (centro e norte) e na América do Norte (BRAY et al. 2018; FERLAY et al., 2019). Nos últimos anos tem sido observado que países desenvolvidos como os Estados Unidos têm apresentado um números de casos e óbitos relativamente menores, enquanto que em países emergentes ou em países subdesenvolvidos, tem-se observado um acréscimo não só em termos de novos casos como também na taxa de óbitos (IARC, 2020). É bem verdade que este panorama global na distribuição dos casos em termos de incidência e mortalidade refletem ao acesso à saúde, bem como ao tratamento; bem difundidos nos primeiros mas que ainda deixam a desejar nestes últimos. À exemplo disso, as regiões subdesenvolvidas do mundo são

responsáveis pelos maiores índices de mortalidade por este tipo de neoplasia, a citar o leste africano, onde este indicador epidemiológico ultrapassa os 80%.

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima aproximadamente 6.650 mil novos casos de câncer de ovário para o triênio 2020/2022, sendo este listado no ranking dos dez tipos neoplásicos mais incidente sobre a população feminina (INCA, 2020). A incidência de casos sobre a população brasileira é de cerca de 8 casos a cada 100.000 mil mulheres, e o risco populacional é consideravelmente menor em relação a população mundial, onde a estimativa é de 7,8 a cada 100 mil mulheres enquanto no Brasil este risco equivale a 3,7 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2020).

Os indicadores ao longo dos anos apontam uma maior sobrevivência relativa em cinco anos após o diagnóstico e que a taxa de incidência ajustada à idade tem diminuído. Mas, a sobrevida em 10 anos é menor que 30% e não melhorou significativamente nas últimas três décadas. Possivelmente, até o ano de 2040 a taxa de mortalidade em decorrência de neoplasias ovarianas aumentará significativamente (CRESS, et al., 2015; BRAY et al., 2018). Com limitações em termos de diagnóstico precoce e tratamento, as neoplasias ovarianas são um notável problema de saúde pública.

1.1.2 Classificação dos tumores epiteliais de ovário

A atual classificação para neoplasias ovarianas é norteada pela Organização Mundial da Saúde (KURMAN, 2014) e baseia-se em princípios histogênicos, caracterizando-os em relação à sua derivação celular. Nesse contexto, os tumores ovarianos são compreendidos em três grandes grupos. O tipo mais comum são as neoplasias epiteliais de ovário, derivadas das células do epitélio de revestimento externo ovariano e correspondem a 90-95% dos casos das neoplasias ovarianas. A estes é dado um maior destaque epidemiológico e os estudos centram seus esforços para melhor entendê-lo e caracterizá-lo tendo em vista um melhor prognóstico. Os demais 5-10% dos casos são representados pelos tumores ovarianos de células germinativas, cuja gênese tumoral reside em células responsáveis pela formação dos ovócitos; e pelos tumores ovarianos de células estromais, sendo o estroma ovariano responsável pela esteroidogênese (American Cancer Society (ACS), 2018).

Com base em critérios histopatológicos, morfológicos, imunohistoquímicos e moleculares, é possível classificar as neoplasias epiteliais de ovário em cinco distintos subtipos: os carcinomas serosos de alto grau e baixo grau, responsáveis por aproximadamente 75% dos casos; carcinomas endometrióides (10% dos casos);

carcinomas de células claras (10% dos casos) e carcinomas mucinosos (cerca de 3% dos casos). Ainda, Shih e Kurman (2004), com base em observações clínicas, patológicas e moleculares de uma série de estudos, propuseram um modelo dualístico para as neoplasias epiteliais de ovário, agrupando-as em duas grandes categorias: os tumores epiteliais de ovário do tipo I e do tipo II. Os tumores epiteliais de ovário do tipo I correspondem aos carcinomas serosos de baixo grau, endometrióides, de células claras e de células mucinosas. Estes possuem crescimento lento, são clinicamente indolentes e geralmente apresentam-se em baixo grau de diferenciação celular, sendo também geneticamente mais estáveis. Tumores epiteliais de ovário do tipo II por sua vez, são representados principalmente pelos carcinomas serosos de alto grau, em geral agressivos, diagnosticados em estágios avançados, além de geneticamente instáveis e de apresentarem um padrão distinto de mutações em relação àquelas que ocorrem nos carcinomas ovarianos do tipo I.

1.1.3 Patogênese

A patogênese do câncer epitelial de ovário não é totalmente esclarecida. Por muitos anos compreendeu-se que o câncer de ovário se origina do mesotélio ovariano - epitélio de revestimento - e invagina o estroma subjacente, resultando em cistos de inclusão que eventualmente sofrem alterações metaplásicas levando ao desenvolvimento de distintos tipos celulares com grande potencial de serem células precursoras cancerosas. No entanto, tal explicação tem sido refutada por diversos autores, uma vez que o ovário normal não possui constituição semelhante às células desses tumores e deste então, diversas teorias tentam por esclarecer a patogênese do câncer de ovário. Ainda que não descartando-se por completo a teoria mesotélio-endotélio, os estudos mais recentes têm proposto outros sítios de origem para os casos de neoplasias epiteliais de ovário, sendo o ovário em muito observado como um possível sítio de implantação secundária de células neoplásicas ou de células em processo de transformação (KIM et al., 2018).

Alterações como carcinoma intraepitelial tubário e carcinomas serosos intraepiteliais tubários tem sido relatados por diversos estudos como potenciais lesões precursoras das neoplasias ovarianas, em especial de carcinomas serosos, sejam eles relacionados a síndromes de predisposição genética ao câncer ou casos esporádicos (TANG et al., 2012; LEE et al., 2007; MALMBERG et al., 2016). Kindelberger et al. (2007) relatam a relação destas lesões nas trompas de falópio com até 70% dos carcinomas serosos de alto grau ovariano e peritoneal de caráter esporádico. Estudos mais

recentes com ensaios *in vivo* e *in vitro* partindo para análises de genômica, transcriptoma e exoma completo também endossam a possível gênese dos carcinomas ovarianos serosos de alto grau com o epitélio das trompas de falópio na grande maioria dos casos, ainda que não descartando-se o possível surgimento a partir do epitélio da superfície ovariana e até mesmo do peritônio (LABIDI-GALY et al., 2017; ZHANG et al., 2019).

A endometriose por sua vez também é uma lesão com estabelecida relação como fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias ovarianas, com uma razão de risco aumentado em até três vezes em especial para carcinoma ovariano de células claras, carcinomas ovarianos tipo endometrióide e carcinomas ovarianos serosos de baixo grau (PEARCE et al., 2012; NEZHAT et al., 2015; KVASKOFF et al., 2015). Algumas evidências corroboram com a hipótese de que o útero pode ser o local de origem para estes subtipos histológicos de neoplasias ovarianas, tais como achados de muitas mutações somáticas compartilhadas entre carcinoma ovariano e endometriose ovariana adjacente, perda de heterozigose e/ou perda de expressão no *PTEN* e perda da expressão de *ARID1A*, sugerindo uma possível relação clonal entre as lesões (ANGLESIO et al., 2015; CHENE et al., 2015). Além disso, a semelhança do carcinoma endometrial uterino tipo I ao câncer de ovário endometriode associado à endometriose no comportamento e no prognóstico, e a idade pré-menopausa associada ao desenvolvimento destes subtipos de carcinomas ovarianos são fatores epidemiológicos que apoiam a hipótese de que o útero pode ser o local de origem do carcinoma endometriode ovariano associado à endometriose. Em sucinto para esta possível via de carcinomas ovarianos, por meio de menstruação retrógrada, células originalmente do útero migram e se implantam secundariamente no ovário, onde posteriormente há uma cascata de eventos de transformação neoplásica (BASSIOUNY et al., 2019; GARAVAGLIA et al., 2018; ANGLESIO, YONG, 2017).

Neoplasias de ovário de histologia mucinosa por sua vez não possui gênese bem definida, sendo algumas hipóteses explanadas, tais como: metaplasia do epitélio da superfície ovariana na junção trompa de falópio-peritônio ou dos cistos de inclusão cortical; evolução a partir de células de transicionais; progressão adenoma-carcinoma; associação com endometriose e ainda uma sugestiva origem associada e células germinativas primordiais (KERR et al., 2013; KOSHIYAMA, MATSUMURA, KONISHI, 2014; ELIAS et al. 2018).

Diante do exposto, é cada vez mais claro que os carcinomas epiteliais de ovário tratam-se de pelo ou menos cinco doenças distintas, com diferentes origens, morfologia

celular, alterações genéticas e características clinico-patológicas, sendo importante o entendimento do câncer epitelial de ovário não como uma doença única com diferentes subtipos histológicos, mas sim como um grupo de tumores altamente diversificados, fazendo com que cada prognóstico e abordagem terapêutica seja única.

1.2 Fatores de risco e protetivos

Por se tratar de uma patologia de significativa heterogeneidade, os fatores de risco ou protetivos relacionados a sua ocorrência possuem associação distinta em se tratando de tumores epiteliais de ovário do tipo I *versus* tumores epiteliais de ovário do tipo II, sendo até mesmo alguns fatores de relação subtipo histológico específicos.

1.2.1 Reprodutivos e hormonais

Há uma evidente associação na literatura de um maior risco para o desenvolvimento de neoplasias ovarianas à maior quantidade de ciclos ovulatórios, independente do subtipo histológico em questão (WALKER et al., 2015; WENTZENSEN et al., 2016). De acordo com a hipótese da ovulação incessante, a ovulação é um processo que demanda de uma alta taxa replicação celular para reparar e restaurar o microambiente epitelial ovariano lesado a cada ciclo ovulatório. Esse constante processo de lesão e reparo pode induzir a ocorrência de mutações de modo permanente, que acumulam-se no DNA celular provocando um distúrbio de funcionamento e predispondo à mutagênese ovariana epitelial (FATHALLA, 1971; HENNESSY, COLEMAN, MARKMAN, 2009).

Em um estudo de coorte (1992-2000), incluindo mais de 300.000 mil mulheres, Fortner et al., (2015) concluíram que a redução na vida útil ovulatória apresenta-se como um fator protetor associado tanto a tumores ovarianos do tipo I quanto a tumores ovarianos do tipo II, sendo melhor associado a tumores de histologia serosa de baixo grau, endometrióide e de células claras. O aumento no número de ciclos ovulatórios por sua vez, confere um risco extremamente alto para tumores do tipo II (MERRITT et al., 2013). De acordo com Gates et al., (2010), cada ano acrescido no número total de anos de ciclos ovulatórios de uma mulher está associado ao aumento de 8% no risco para o desenvolvimento de tumores serosos invasivos e endometrioides, bem como a um aumento de 3% no risco no desenvolvimento de tumores mucinosos. Logo, fatores que suprimem ou interrompem a ovulação podem estar associados a diminuição do risco ao longo da vida da mulher em desenvolver câncer de ovário.

O uso de contraceptivos orais está entre os fatores protetivos relacionados ao câncer de ovário mais bem estabelecidos, muito embora haja heterogeneidade de resposta por tipo histológico. Estima-se que cinco anos de duração no uso de contraceptivos orais confira um risco diminuído para todos os subtipos de tumores epiteliais de ovário (BERAL et al., 2008; NAGLE et al., 2008; MERRITT et al., 2013; FORTNER et al., 2015; WENTZENSEN et al., 2016.). De modo geral, o efeito protetor associado é de 5% ao ano de uso e implica em proteção média de 40-50% ao longo da vida (PELUCCHI et al., 2007; WALKER et al., 2015; CHIEN, POOLE et al., 2017). Vessey, Yeates e Flynn (2010) observaram que o aumento no tempo de uso está relacionado a maiores benefícios na redução do risco, com um declínio progressivo no risco de morte em relação à duração total do uso, e um efeito protetor persistente por mais de 20 anos após a interrupção do uso. No entanto, a ressalva existe quando consideramos tumores epiteliais ovarianos do tipo Borderline, onde o efeito protetor conferido ao uso de contraceptivos orais não é claro (RIMAN et al, 2001; RIMAN, NILSSON, PERSSON, 2004).

Um conjunto consistente de evidência também associa a paridade à redução de risco no desenvolvimento de carcinomas ovarianos ao, de semelhante modo, promoverem diminuição dos ciclos ovulatórios ao longo da vida. Em comparação com a nuliparidade, a paridade é associada a uma redução significativa de 29% no risco de mortalidade (KIM et al., 2017). Com efeito protetor para todos os subtipos histológicos, a redução de risco associada a paridade é mais fortemente observada para carcinomas ovarianos do tipo I, em especial os endometrióides e de células claras, com possível efeito adicional à paridade crescente (NAGLE et al., 2008; GATES et al., 2010; YANG et al., 2011; MERRITT et al., 2013; SCHÜLER et al., 2013; FORTNER et al., 2015; WENTZENSEN et al., 2016; KIM et al., 2017; KOUSHIK et al., 2017). De semelhante modo, o aleitamento materno confere uma redução de risco para todos os carcinomas ovarianos, mas em especial para aqueles tipo I (MERRITT et al., 2013; KOUSHIK et al., 2017) com forte associação aos subtipos células claras e endometrióide (NAGLE et al., 2008; WENTZENSEN et al., 2016). A duração da lactação também é especialmente importante: quanto maior o tempo de lactação, menor o risco associado (KOUSHIK et al., 2017). Novamente, o efeito protetor da paridade sob tumores ovarianos borderline é aparentemente mais fraco (RIMAN, NILSSON, PERSSON, 2004).

A idade à menarca e à menopausa também são fatores hormonais relacionados ao câncer de ovário. Há um aumento do risco com a idade avançada da menarca, em especial tratando-se de carcinomas de células claras (FORTNER et al., 2015; WENTZENSEN et

al. 2016; KOUSHIK et al., 2017). Quanto a idade na menopausa, a associação dá-se significativamente a tumores tipo I e apenas sugestivamente associado a tumores do tipo II. Uma menopausa acima dos 55 anos, considerada tardia associa-se com a carcinomas de células claras e endometrioides, enquanto a menopausa precoce (antes ou igual aos 40 anos) por sua vez, confere maior risco associado à tumores mucinosos (WENTZENSEN et al. 2016). Uma idade mais jovem na menopausa por sua vez está associada à redução de risco nestes subtipos histológicos de tumores ovarianos (FORTNER et al., 2015). Gates et al. (2010) também observam que entre as mulheres acima dos 50 anos, há uma modesta elevação do risco para carcinomas serosos de alto grau, sendo este fator hormonal não relacionado a tumores mucinosos.

A terapia de reposição hormonal – TRH – também possui relação com o desenvolvimento de neoplasias ovarianas, mas com achados conflitantes quanto a cada subtipo histológico. De acordo com Yang et al., (2011), a terapia de reposição hormonal representa risco aumentado para todos os subtipos histológicos, em especial seroso e com exceção para carcinomas mucinosos. Por sua vez, Wentzensen et al., (2016) observaram que um uso de pelo menos 5 anos associou-se com um risco aumentado para carcinomas serosos e endometrióide, mas com risco reduzido de carcinoma de células claras. A associação do uso de TRH e risco aumentado associado para carcinomas serosos e endometrioides também foi visto por Fortner et al., (2015).

Ainda, a infertilidade pode ser fator associado ao aumento do risco de tumores endometrioides e de células claras (MERRITT et al., 2013).

1.2.2 Relacionados ao estilo de vida

O estilo de vida como fator associado ao desenvolvimento de neoplasias é de fundamental importância porque apesar do fator genético/hereditário exercer forte influência, bem como fatores reprodutivos e hormonais no caso de neoplasias ovarianas, o estilo de vida é uma conduta pessoal e pode ser alterada de modo a conferir proteção à vida da mulher. O índice de massa corporal é um importante fator de risco associado ao desenvolvimento de carcinomas ovarianos, onde exerce influência independente do subtipo histológico. Em especial, há uma associação positiva entre o índice de massa corporal (IMC) elevado e um risco maior no desenvolvimento de tumores do tipo I dos subtipos mucinosos, endometrióides e de células claras, (NAGLE et al., 2008; GATES et al., 2010; YANG et al., 2011; OLSEN et al., 2013; KIM et al., 2017; ZAMORANO et al., 2019). Nesse contexto, a atividade física embora não seja consolidada na literatura como

um fator atenuante do risco para câncer epitelial de ovário, tem sido relatado por alguns estudos, que sugerem então que a atividade física pode estar inversamente associada a mortalidade entre mulheres com câncer de ovário (CANNIOTO et al., 2016; ABBOTT et al., 2018).

O tabagismo, bem estabelecido como fator de risco para alguns tipos de cânceres também pode estar associado ao câncer de ovário, cujo risco é aumentado em mulheres fumantes quando comparado com aquelas que nunca fumaram. Também há um aumento significativo de 25% no risco de morte por câncer de ovário em comparação com o histórico negativo de tabagismo (GAITSKELL, 2012; KIM et al., 2017). Considerando a histologia tumoral, o risco é mais elevado para tumores mucinosos, (GATES et al., 2010; GAITSKELL, 2012; WENTZENSEN et al., 2016) sendo a associação com outros subtipos histológicos não muito clara e por vezes conflitantes.

1.2.3 Fatores ginecológicos

A histerectomia possui achados conflitantes na literatura quanto a conferir redução ou a elevar o risco de desenvolvimento de neoplasias ovarianas. Embora alguns estudos sugiram efeito protetor da histerectomia no câncer de ovário, a grande maioria dos estudos mais recentes tem sustentado que por si só a histerectomia não possui associação significativa com a diminuição do risco de câncer de ovário e do contrário: há um risco moderadamente aumentado de câncer de ovário após a histerectomia (MILLS, RIORDAN, CRESS, 2004; NAGLE et al., 2008; JORDAN et al., 2008; NESS et al., 2011). A revisão sistemática e metanálise de Jordan et al., 2013 aponta para uma mudança temporal na associação entre histerectomia e risco de câncer de ovário antes e depois dos anos 2000. Outros fatores hoje estão relacionados a este evento cirúrgico, afetando em como o procedimento exerce influência no risco de câncer de ovário. A saber: hoje tem-se menores taxas de histerectomia, um menor número de salpingo-ooforectomia bilateral realizadas em concomitante e uma idade média maior no momento da cirurgia (GIMBEL, SETTNES, TABOR 2001; SPILSBURY et al., 2006; LUNDHOLM et al., 2009; EREKSON et al., 2009). No contexto associado a outras variáveis ginecológicas e hormonais, como miomas, endometriose e o uso de TRH, os resultados são diferentes. Rice, Hankinson e Tworoger (2014) verificaram que a histerectomia no contexto da TRH confere um risco 20% menor de câncer de ovário, sendo um pouco mais forte para tumores não-serosos quando em comparação com tumores serosos.

Os achados de Dixon-Suen et al., (2019) verificaram que a histerectomia aparenta reduzir substancialmente o risco em desenvolver câncer de ovário entre aquelas mulheres com endometriose ou miomas. Poucos estudos relativamente recentes que ainda encontram associação entre histerectomia e redução no risco para câncer de ovário o fazem relacionando à subtipos histológicos específicos, como endometrióide e células claras, (MERRITT et al., 2013; WENTZENSEN et al., 2016), o que condiz com evidências na literatura de que o útero pode ser o local de origem para estes subtipos histológicos de neoplasias ovarianas. De modo geral, a histerectomia em isolado hoje é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias ovarianas.

Diversos estudos epidemiológicos, coortes e meta-análises por sua vez apontam a ligação tubária com importante na redução de risco de câncer epitelial de ovário. De acordo com Rice, Hankinson e Tworoger (2014), mulheres submetidas a uma ligadura tubária tiveram uma redução no risco de 24% para câncer de ovário em comparação com as mulheres que não foram submetidas ao procedimento. Também é pertinente para este fator associado ao câncer de ovário que a redução no risco varia de acordo com o histotipo tumoral, sendo significativa para tumores de células claras, endometrióides e serosos respectivamente, mas sem redução significativa no risco de tumores mucinosos (GAITSKELL et al., 2016; WANG et al., 2016; WENTZENSEN et al., 2016). Koushik et al., (2017) também verifica uma redução no risco associada a ligadura tubária para o câncer de ovário limítrofe. Especula-se que a redução no risco para câncer epitelial de ovário associado a ligadura tubária seja pelo bloqueio no fluxo de menstruação retrógrada e de substâncias cancerígenas pelas trompas até os ovários e a pelve. Além disso, nos casos em que há remoção das trompas, extingue-se potenciais locais de lesões percussoras à neoplasias ovariana.

A endometriose por sua vez, é uma doença inflamatória ginecológica caracterizada pela presença do endométrio, tecido que normalmente reveste o útero, fora da cavidade uterina, com implantes em órgãos extra-pélvicos, como os ovários. Apesar de benigna, estudos tem descrito um perfil mutacional semelhante ao do câncer de ovário, como por exemplo mutações em *ARID1A*, *PIK3CA*, *KRAS* e *PPP2RIA*, além da capacidade intrínseca destas células de invasão local e resistência à apoptose (LEE et al., 2016; ANGLESIO et al., 2017). Logo, diversos estudos têm associado a endometriose como um fator que eleva o risco para neoplasias ovarianas, em especial para os histótipos de células claras, endometrióide e seroso de alto grau. (WENTZENSEN et al., 2016;

BRILHANTE et al., 2017; KOUSHIK et al., 2017; WENDEL, WANG, HAWLKINS, 2018).

1.2.4 Associação controversa

Entre outros fatores, de associação controversa e pouco explorados para o câncer epitelial de ovário é a etnia e a altura dessas mulheres. As estatísticas do câncer de ovário por Torre et al., (2018) apontam que a maior prevalência de câncer de ovário é observada em mulheres brancas não hispânicas (12,0 por 100.000), seguidas por mulheres hispânicas (10,3 por 100.000), mulheres negras não hispânicas (9,4 por 100.000) e mulheres asiáticas / das ilhas do Pacífico (9,2 por 100.000). No entanto, poucos são os estudos que compararam associações específicas de etnia no câncer de ovário (JOHN et al., 1993; NESS et al., 2000; MOORMAN et al., 2009; WU et al., 2015), e a possível relação existente é controversa por múltiplos fatores, tais como a sub-representação de mulheres não negras nos estudos epidemiológicos a respeito de câncer de ovário e como os demais fatores protetivos ou de risco estão relacionados a cada grupo étnico, não podendo este então ser considerado de modo isolado (PERES et al., 2017). O único estudo encontrado até então sobre disparidades de sobrevivência entre grupos étnicos com foco principal na etnia tão somente relatam que em comparação com mulheres brancas não hispânicas, mulheres negras não hispânicas apresentam um risco de mortalidade 28% maior, enquanto as mulheres asiáticas / das ilhas do Pacífico tiveram um risco na mortalidade ligeiramente reduzido. (STENZEL, BUAS, MOYSICH, 2019).

Outro fator possivelmente associado é a altura do indivíduo. Muitos estudos focados na investigação dessa associação possuem resultados inconsistentes, enquanto alguns outros estabelecem associação positiva, inclusive não somente para o câncer de ovário. No grande estudo prospectivo de Green et al. (2011), realizado no Reino Unido contando com mais de um milhão de mulheres, observou-se que a incidência total de câncer aumentou com cada acréscimo de 10cm à estatura, bem como para dez tipos específicos de câncer incluindo o câncer de ovário, sem que esta variação fosse influenciada por outros fatores tais como diferentes grupos socioeconômicos, consumo de álcool, IMC, atividade física, idade da menarca, paridade, idade quanto ao filho gestado, estado menopáusico e uso de contraceptivos orais ou terapia de reposição hormonal.

Dada a heterogeneidade dos cânceres epiteliais de ovário, Schouten et al., 2008 observaram que esta associação é mais forte para os subtipos de carcinoma ovariano

endometrióide e seroso, sem associação alguma com o subtipo mucinoso, muito embora a diferença entre os subgrupos histológicos não tenha sido estatisticamente significativa. Esta mesma associação positiva entre altura e risco de câncer de ovário tem sido observada por outros estudos ao longo do tempo (JORDAN, WEBB, GREEN, 2005; ENGELAND et al., 2003; JONSSON et al., 2003).

É possível que a ação hormonal e os eventos de renovação celular mediado por fatores de crescimento como os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) (MORRIS et al., 2006; CLAYTON et al., 2011) e o elevado número de células dado o maior tamanho corporal ofereça maiores chances para eventos mutacionais e malignização celular (NUNNEY, 2018) sejam fatores envolvidos na associação positiva descrita por estes autores. É importante salientar que a altura média populacional tem sido maior nas últimas décadas. Logo, tendo este fator efeito tão incisivo sobre a incidência de câncer é de particular importância sua investigação em caráter populacional e a devida atenção a cada história pessoal de câncer.

Uma relação causal entre o uso do talco perineal e o câncer de ovário é fortemente discutida na literatura (CRAMER et al., 1999; MERRITT et al., 2008; GATES et al., 2010; PENNINKILAMPI et al., 2018; TAHER et al., 2019). Embora essa associação seja consistente quando avaliado o conjunto de publicações até então, o estudo mais recente abordando essa temática, considerando o peso de evidências como estudos de coorte, dados de estudos *in vivo*, a avaliação *in vitro* da genotoxicidade deste composto, as hipóteses de exposição e transporte retrogrado até os ovários e os vieses dos estudos conduzidos em especial do tipo caso controle concluem haver não suporte na associação entre o uso do talco perineal e o câncer de ovário (GOODMAN et al., 2020).

1.2.5 Fatores genéticos

A grande maioria das neoplasias ovarianas ocorre esporadicamente. No entanto, sabe-se que um *background* genético relacionado a mutações que ocorrem principalmente em genes supressores tumorais, oncogenes ou genes envolvidos direta ou indiretamente no reparo de DNA promovem um risco mais elevado em desenvolver um tumor ou um espectro de neoplasias do que o observado na população em geral.

Nesse sentido, é possível caracterizar dois grupos distintos quanto a suscetibilidade em desenvolver tumores, podendo as neoplasias estarem associadas a uma predisposição familiar ou a uma predisposição hereditária. Quanto ao primeiro, mutações patogênicas em diversos genes e polimorfismos modificadores de risco são responsáveis

por uma parte da ocorrência deste agregado de casos de câncer. Mutações de linhagem germinativa que conferem a perda de função do gene *BRIP1*, por exemplo, foram recentemente relacionada com um alto risco para câncer de ovário familiar de início tardio, especialmente o subtipo epitelial seroso de alto grau (WEBER-LASSALE et al., 2018). De semelhante modo, mutações patogênicas de linhagem germinativa em genes como *BRIP1*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BARD1* e *PALB2* são encontradas em famílias com câncer de ovário e elevam o risco em desenvolver este tipo de neoplasia (MEINDL et al., 2010; LOVEDAY et al., 2011; RAMUS et al., 2015; NORQUIST et al., 2016) e mutações em outros genes como *CDH1*, *BLM*, *NBN*, *PTEN*, *RAD51B*, e *STK11* são possivelmente relacionados ao câncer de ovário, ainda que conferindo um baixo risco (CASADEI et al., 2011; NIELSEN, HANSEN, SORENSEN, 2016). Além disso, estudos de associação genômica (GWAS) tem identificado uma ampla quantidade de alelos que conferem susceptibilidade para o câncer epitelial de ovário, desde alelos comuns a raros, com diferentes *scores* de penetrância (GOODE et al., 2010; EARP et al., 2014; PHELAN et al., 2017).

Apesar de envolvidos na etiopatogênese de neoplasias ovarianas, estas mutações e polimorfismos atribuem um risco de baixo a moderadamente mais elevado para o câncer epitelial de ovário quando em comparação com a população em geral. Também não há padrão de herança bem definido nem características epidemiológicas claras. Em oposição, as síndromes de predisposição ao câncer são caracterizadas por um padrão de herança mendeliano, em geral autossômico dominante, cujos alelos são altamente penetrantes e o risco é consideravelmente elevado para o desenvolvimento de tumores (STEINKE et al., 2013). Estima-se que a predisposição hereditária a câncer de ovário seja responsável por aproximadamente 20% de todos os cânceres epiteliais de ovário (KATABUCHI, 2017). Nesse contexto, a HBOC (HBOC, do inglês: *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*), decorrente de mutações patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2* e a Síndrome de Lynch, decorrente de mutações patogênicas em *MLH1*, *MLH2*, *MSH6* e *MSH2* são as síndromes clássicas de predisposição ao câncer de ovário hereditário, sendo responsáveis por aproximadamente 75-90% dos casos de câncer de ovário hereditário.

1.3 Síndrome de Lynch

A Síndrome de Lynch, anteriormente nomeada Síndrome do Câncer Colorretal Hereditário Sem Polipose (HNPCC, do inglês: *Hereditary Non-Polyposis Colorectal*

Cancer Syndrome), é uma síndrome de predisposição ao câncer com padrão de herança autossômico dominante, manifesto em decorrência de mutações patogênicas monoalélicas nos genes do sistema de reparo de pareamento incorreto de bases ao DNA: *MLH1*, *MLH2*, *MSH6* e *MSH2*, elevando a predisposição a uma ampla variedade de tumores (LEENEN et al., 2012). Tumores ginecológicos em portadoras da síndrome de Lynch são frequentes. Em cerca de 50% dos casos, um carcinoma endometrial ou ovariano é o “câncer sentinela”, apresentando uma estimativa de risco muitas vezes excedente ou igual ao risco de desenvolver um câncer de cólon (LU et al., 2004; LU, DANIELS, 2013). A síndrome de Lynch é a segunda principal síndrome relacionada à predisposição hereditária para neoplasias ovarianas, sendo responsável por 10-15% de todos os casos de câncer de ovário hereditário. Há um aumento do risco para este tipo de neoplasia em até 24%, variando de acordo com o gene que carrega a variante patogênica (LYNCH et al., 2009; ENGEL et al., 2012) O risco ao longo da vida também é elevado, pois enquanto o risco médio populacional em geral é de 1,3%, portadoras da síndrome de Lynch possuem um risco estimado entre 9-12% em desenvolver alguma neoplasia epitelial de ovário (BONADONA et al., 2011; KUZNIA, ROETT, 2015).

1.3.1 Histórico

A Síndrome de Lynch foi uma das primeiras síndromes de predisposição ao câncer a ser descrita. Em 1895, o médico patologista Aldred Scott Warthin interessou-se em documentar o histórico familiar de recorrentes casos de câncer, já observando o padrão mendeliano autossômico dominante, com ocorrência especial de câncer de colo, estômago e útero, denominando-a de família G. Esta descrição encontra-se publicada datando-se de 1913, junto com outros dois pedigrees semelhantes dos registros da Escola de Medicina da Universidade de Michigan, ao qual era vinculado (WARTHIN, 1913). Uma atualização destes casos foi publicada por seus colegas em 1936 (HAUSER, WELLER, 1936), lançando as bases para as posteriores descobertas que culminaram na caracterização da síndrome de Lynch.

Em 1962, Henry Lynch detalhou um histórico familiar com excessivos casos de câncer colorretal, transmitidos ao longo de várias gerações, o fazendo levantar a hipótese de uma nova síndrome com intensa predisposição ao câncer colorretal mas sem a presença de múltiplos adenomas colônicos, achados observados em portadores da Polipose Adenomatosa Familiar (FAP, do inglês: *Familial Adenomatous Polyposis*) mas que não

encaixava-se com o histopatológico dos membros da família em questão, a quem denominou de família N. Junto com os achados de Marjorie Shaw, da Universidade de Michigan, cujos dados clinicopatológicos eram comparáveis aos da Família N, (ao qual ela chamou de família M, de Michigan), tem-se a publicação dos pedigrees de ambas as famílias, M e N, em 1966, com diversos membros afetados por tumores gástricos, colorretais e endometriais (LYNCH et al., 1966).

Ao revisar extensivamente os achados de Warthin, Lynch juntamente com a médica e assistente social Anne Krush, coletou mais uma série de evidências da predisposição ao câncer e estabeleceu que os tumores nestas famílias constituíam um agrupamento familiar de cânceres sob padrão autossômico dominante (LYNCH, KRUSH, 1971) publicando posteriormente um relatório detalhado do diagnóstico precoce por meio do aumento da vigilância do que foi nomeado por Síndrome do Câncer Familiar (LYNCH, 1971). Apesar da forte base clínica fornecida pelos estudos do Henry Lynch e de inúmeros artigos posteriores relatando famílias com predisposição ao câncer com achados similares aos publicados por Warthin e Lynch, o seu caráter como síndrome hereditária de predisposição ao câncer só foi estabelecido a partir de 1993, após a elucidação da etiologia genética e da patogênese dos cânceres associados ao LS em casos familiares.

Durante a década de 80 a nomenclatura da síndrome sofreu modificações com o intuito de melhor caracterizá-la. Para diferenciar do fenótipo da Polipose Adenomatosa Familiar, em 1985 a então Síndrome do câncer familiar (SCF) passou a ser denominada de Câncer Colorretal Hereditário Sem Polipose (HNPCC) pelo Dr. Henry Lynch (LYNCH et al., 1985). No entanto, isso focou toda a atenção para os achados de tumores colorretais, quando apesar da prevalência de tumores do cólon proximal (LYNCH, LYNCH, HARRIS 1977) já se era sabido desde as descrições iniciais a predisposição à cânceres extracolônicos.

Ainda em 1984, tem-se a primeira literatura a sugerir o uso da nomenclatura Síndrome de Lynch (BOLAND, TRONCALE, 1984), trazendo os termos Síndrome de Lynch I para descrever famílias onde os achados tumorais restringiam-se apenas a câncer colorretal e Síndrome de Lynch II, onde além dos tumores colorretais, haviam tumores extracolônicos. O próprio Lynch passou a utilizar indistintamente as duas nomenclaturas (LYNCH, LYNCH, 1985; LYNCH et al., 1991) Ao longo dos anos a síndrome passou a ser melhor estudada e esclarecida, observando-se que além da grande sobreposição fenotípica dos achados entre o que se entendia por síndrome de Lynch I e Lynch II,

HNPCC também era nome impróprio, que limitava a caracterização correta e confundia o entendimento da síndrome. Em um estudo mais recente há o relato da ocorrência de tumores adenomatosos associados a Síndrome de Lynch (KALADY et al., 2015), sendo portanto a ausência ou presença deste achado histopatológico um critério que não deve ser utilizado como distintivo nos tumores da desta síndrome. Por consenso, consolidou-se então a nomenclatura de Síndrome de Lynch para esta síndrome de predisposição ao câncer hereditário (BOLAND, 2005; LYNCH et al., 2015).

Em 1991, os critérios de Amsterdam I foram publicados. É resultado dos esforços do Grupo Internacional Colaborativo em HNPCC, criado em 1989, para definir critérios clínicos que auxiliassem o diagnóstico da então ainda denominada HNPCC (Tabela 1) (VASEN et al., 1991). Entendia-se que esta era uma síndrome de predisposição ao câncer relacionada ao desenvolvimento de tumores colorretais cuja principal característica era o não desenvolvimento de pólipos. Por isso, os critérios de Amsterdam I são focados no diagnóstico clínico deste seletivo grupo de tumores colorretais. Diante da descrição de diversos tumores extracolônicos associados ao espectro tumoral da síndrome, como frequências significativamente aumentadas de câncer de endométrio, estômago, intestino delgado, sistema hepatobiliar, trato urológico superior e ovário (WATSON, LYNCH, 1994), em 1999 foi criada uma nova versão dos critérios de Amsterdam I, denominada de critérios de Amsterdam II para incorporar critérios que considerassem a ocorrência destes tumores extracolônicos (VASEN et al., 1999).

Em 1993 uma série de achados relacionaram a instabilidade de microssatélite como marca fenotípica dos tumores associados a síndrome de Lynch (AALTONEN et al., 1993; PELTOMÄKI et al., 1993; THIBODEAU; BREN; SCHAID, 1993). Como supracitado, o caráter da síndrome de Lynch como uma síndrome hereditária de predisposição ao câncer só foi estabelecido a partir de 1993, com elucidação da etiologia genética da mesma. A associação aqui feita da instabilidade de microssatélite em tumores clinicamente enquadrados na Síndrome de Lynch deu embasamento para a possibilidade de que erros em genes da via do sistema de reparo de DNA por mal pareamento de bases seria a causa genética da doença. De fato, no mesmo ano de 1997 o gene *MSH2* foi identificado como sendo o primeiro locus da síndrome de Lynch (PELTOMÄKI et al., 1993; FISHEL et al., 1993). Este é o marco da “era genética” da Síndrome de Lynch. Posteriormente foram identificados os genes *MLH1* e *PMS2*, em 1994 e *MSH6* em 1997 (PAPADOPOULOS et al., 1994; BRONNER et al., 1994; NICOLAIDES et al., 1994;

MIYAKI et al., 1997), sendo estes os principais genes da via de reparo de DNA do tipo MMR (do inglês: *Mismatch Repair*).

Considerando o grande achado da instabilidade de microssatélites em tumores da LS, em 1997 foram publicadas as Diretrizes de Bethesda, um compilado de recomendações formuladas pela Conferência internacional sobre HNPCC promovida pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, no ano anterior. Estas diretrizes são mais amplas que os critérios de Amsterdam e consideram um painel consenso com cinco marcadores de microssatélites (BAT-25 e BAT-26, D2S123, D5S346 e D17S250) (BOLAND et al., 1998), incluindo assim além dos critérios clínicos, um critério molecular para o diagnóstico da síndrome. Por isso, as diretrizes de Bethesda são mais sensíveis ao identificar um espectro de pacientes em risco, aumentando assim a sensibilidade diagnóstica para a Síndrome de Lynch. Em 2004 houve uma revisão dos critérios culminando nas “Diretrizes de Bethesda revisadas” (RODRIGUEZ-BIGAS, et al., 1997; UMAR et al., 2004; PINO; CHUNG, 2010). Estas recomendações são apresentadas neste trabalho na Tabela 4, página 42.

Por ser uma síndrome com histórico relativamente recente, diversos estudos continuam por preencher marcos no histórico da Síndrome de Lynch.

1.3.2 Etiologia

1.3.2.1 Mecanismos genéticos na patogênese da Síndrome de Lynch

Variantes patogênicas nos genes *MLH1*, *MLH2*, *MSH6* e *PMS2*, responsáveis pela via de reparo de DNA do tipo MMR são a causa genética da síndrome de Lynch; uma das síndromes de câncer hereditário mais comum (DE LA CHAPELLE, 2005). Esta é uma via de reparo de DNA cuja função do produto proteico destes genes compreende a identificação do erro de pareamento na fita de DNA nascente, o recrutamento da maquinaria celular de reparo e a excisão da fita *upstream* ao sítio de mal pareamento, o que permite a DNA polimerase sua atuação na síntese correta do fragmento, mantendo assim a fidelidade do genoma. Erros de pareamento ocorrem normalmente, muito embora em taxas ínfimas, mas a sua não correção está intimamente ligada a mutações que podem deflagrar um processo tumorigênico, fazendo com que a célula perca a capacidade de manutenção de suas funções vitais normais (KASTRINOS; STOFFEL, 2014).

Estas variantes patogênicas de origem germinativa ocorrem em uma das duas cópias alélicas de um dos genes supracitados, sendo o segundo alelo funcional. De modo geral, essas variantes são herdadas de um dos pais, mas um segundo evento possível é

que a alteração em questão surja no indivíduo sem que nenhum dos seus progenitores apresente-a. São essas chamadas de mutações *de novo* e na SL representam um evento raro, correspondente a apenas 2,3% dos casos (WIN et al., 2011). De uma maneira ou de outra, um segundo evento, desta vez de natureza somática é necessário para que se haja a perda da heterozigosidade e conseqüentemente a perda da função do sistema MMR. Além disso, a inativação bialélica do gene envolvido promove um acúmulo de mutações em regiões do microssatélite, tornando-os instáveis.

1.3.2.2 Mecanismos epigenéticos na patogênese da Síndrome de Lynch

Uma parcela dos casos de síndrome de Lynch tem etiologia epigenética. Aproximadamente 1-3% dos casos em que o paciente não possui nenhuma variante patogênica de linhagem germinativa em um dos genes do sistema MMR ocorre devido a deleções dos éxons 8 e 9, os dois últimos éxons do gene *EPCAM*. (PELTOMAKI et al., 1993; GUARINOS et al., 2010; KUIPER et al., 2011) Este é um gene responsável por codificar uma molécula de adesão celular epitelial que, apesar de mediar diversos processos celulares, em nada está envolvida com o sistema MMR. Fisicamente, o *EPCAM* está localizado *upstream* 17 kilo-bases do gene *MSH2* e a deleção em questão, ao interromper a porção 3' terminal de *EPCAM*, expande o seu quadro de leitura e silencia a região promotora de *MHS2* por hipermetilação, reduzindo sua expressão ou em geral o inativando (KEMPERS et al., 2011; TUTLEWSKA, LUBINSKI, KURZAWSKI, 2013).

Esse processo epigenético é restrito a células que expressam *EPCAM*, logo um padrão de mosaico é observado em pacientes que possuem esta mutação em *EPCAM* quanto a expressão de *MSH2*. O espectro tumoral também parece diferir quando comparados com aqueles que possuem clássicas mutações de perda de função em *MSH2* (LYNCH et al., 2011). No entanto, como a deleção geralmente apresenta-se em heterozigose ela também é herdável, e por este motivo confere com frequência o fenótipo da síndrome de Lynch da mesma forma que os genes clássicos (KEMPERS et al., 2011).

A metilação da região promotora de *MLH1*, também denominada de epimutação constitucional caracteriza um segundo evento epigenético pelo qual os genes do sistema MMR podem estar intactos mas ainda assim estar envolvido da etiologia da Síndrome de Lynch, uma vez que não há expressão do gene. As epimutações de *MLH1* mostram ser hereditárias, mas com padrões mendelianos e não mendelianos distintos, dependendo do mecanismo subjacente envolvido e está envolvida com até 10% dos casos onde não há

mutação nos genes MMR de LS mas os tumores são deficientes em *MLH1* (LYNCH et al., 2015).

Por fim, estudos recentes tem descrito que uma outra marca epigenética envolvida no sistema de reparo por mal pareamento de DNA é a trimetilação da histona H3 no resíduo 36 da lisina (H3K36me3). Essa maca de histona trimetilada é importante para o recrutamento do complexo MutSa no cerne na replicação, por meio da interação entre este resíduo trimetilado com o domínio PWWP de *MSH6*. Apesar de diversas enzimas estarem envolvidas na metilação e desmetilação de H3K36, uma única enzima possui a atividade de trimetiltransferase, sendo ela produzida pelo gene *SETD2*. Logo, mutações que levam a perda de função de *SETD2* levam a perda de função do MMR; não pela sua ineficiência, mas pela incapacidade de interação com o sítio de mal pareamento. Li (2013) e Li et al., (2013), por meio de estudos *in vivo* demonstram que as células sem a trimetiltransferase *SETD2* apresentaram instabilidade de microssatélites e exibiram uma frequência de mutações espontâneas elevada, o que caracteriza a deficiência de MMR. Assim, não diferente do que ocorre no desenvolvimento de muitos cânceres, aqueles relacionados à Síndrome de Lynch também possuem o envolvimento de mecanismos epigenéticos como forma alternativa de sua manifestação e são importantes no entendimento etiológico da patogênese.

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

O *mismatch repair* é uma via de reparo de DNA altamente conservadas em todos os filamentos, cuja principal função é manter a fidelidade do genoma, corrigindo bases mal pareadas e loops gerados por eventos de inserção e deleção durante o processo de replicação (GROOTHUIZEN, SIXMA, 2016). Sua ação ou a participação de proteínas da via também é importante para outros mecanismos de reparo de DNA, sinalização apoptótica e eventos de recombinação (KUNKEL, 2004; SCHRADER et al., 2007; MUKHERJEE, RIDGEWAY, LAMB, 2010; RICHMAN, 2015). Durante a síntese de DNA, as polimerases de DNA envolvidas adicionam nucleotídeos à fita nascente com uma taxa de erro de aproximadamente 10^{-4} a 10^{-5} por nucleotídeo. A atividade revisora exonucleotídica destas mesmas DNA polimerases por sua vez diminuem essa taxa de erro a aproximadamente 10^{-7} e, por meio do mecanismo de ação do reparo tipo *mismatch repair*, essa taxa de erro torna-se ainda mais ínfima, reduzida mais 100-1000 vezes para 10^{-9} - 10^{-10} por nucleotídeo. Logo, um sistema de reparo de pareamento incorreto de DNA comprometido ou não funcional está relacionado com o acúmulo de mutações, sejam

somática ou germinativas que suscetibilizam ao desenvolvimento de câncer em humanos e outros mamíferos (JETER, KOHLMANN, GRUBER, 2006; LI, 2008).

Dada a importância, a via de reparo de pareamento incorreto de bases é altamente conservada em todos os filos, sendo as etapas de reconhecimento do erro, sua remoção e ressíntese do fragmento presente de procariotos à eucariotos, com sutis diferenças evolutivas. O *mismatch repair* foi descoberto por na década de 70, tendo o seu mecanismo primariamente descrito em células procarióticas de *Escherichia coli* (WILDENBERG, MESELSON, 1975; WAGNER, MESELSON, 1976). Logo, em organismos procariotos, aplicando-se o que se sabe pelos achados em *E. coli*, o homodímero MutS reconhece os eventos de mal pareamento gerados durante a replicação, liga-se a estas bases mal pareadas e a reação com o trifosfato de adenosina (ATP, do inglês, *Adenosine Triphosphate*) promove uma mudança conformacional nesta proteína que a permite deslizar pela fita de DNA como um grampo (BJORNSON et al., 2003).

Em seguida, a forma ativa de MutS recruta o MutL e a interação física entre ambas recruta uma terceira proteína, o MutH, cuja função é de endonuclease de restrição, formando o complexo MutS-MutL-MutH, que se desloca no DNA até atingir uma sequência hemi-metilada (GATC). É a metilação pouco presente que discrimina as fitas de DNA molde da recém sintetizada, direcionando a ação do mecanismo de reparo. A quebra unifilar da sequência de DNA recém-sintetizada contendo o erro por MutH sinaliza para a ação de helicases e exonucleases que removem o trecho contendo o erro e, por fim, a ação da DNA polimerase III, proteínas de ligação ao DNA unifilar e DNA-ligases promovem a síntese de DNA de modo correto e a junção das extremidades. Em bactérias, várias exonucleases de sentido 5'-3' ou 3'-5' ou helicases (Exo1, ExoVII, ExoX, RecJ, UvrD) contribuem para as funções do sistema MMR, de modo que o mecanismo de reparo MMR em procariotos é um processo bidirecional (MODRICH, 1989; LÄNGLE-ROUAULT, MAENHAUT-MICHEL, RADMAN, 1987; LAHUE, MODRICH, 1988; MECHANIC, FRANKEL, MATSON, 2000; BURDETT et al., 2001, PUTNAN, 2016).

As sutis diferenças citadas entre o mecanismo de reparo do tipo *mismatch repair* entre procariotos e eucariotos envolvem uma maior complexidade quanto as funções das proteínas, que diferentemente dos procariotos, funcionam em heterodímeros e variantes destes nos seres procariotos. Logo, ao longo do processo de replicação dos eucariotos, as bases incorporadas incorretamente ou *loopings* são reconhecidos principalmente pelo heterodímero MutS α , formado pelas proteínas MSH2 e MSH6, que se ligam a pequenas

inserções e deleções de até três nucleotídeos (HARFE, JINKS-ROBERTSON, 2000; LI, 2003; MCCULLOCH, GU, LI, 2003; GORMAN et al., 2007).

Cada proteína do complexo heterodimérico possui um sítio de ligação a ATP, cuja ligação modula a função de MutS α . O *turnover* catalítico existente entre as moléculas energéticas ATP e ADP e as proteínas MSH6 e MSH2 fazem com que o complexo tenha a estrutura dinâmica necessária para procurar, encontrar e corresponder de modo efetivo a um mal pareamento de DNA (MAZUR, MENDILLO, KOLODNER, 2006; HEINEN et al., 2011; MONTI et al., 2011; HINGORANI, 2016). Quando o complexo reconhece um erro de pareamento entre as bases de DNA ou um *loop*, MutS α é transformado em um estado ligado a ATP e forma um complexo estável onde a alteração da estrutura conformacional do heterodímero confere a este uma forma de estrutura em grampo, capaz de se dissociar da incompatibilidade e deslizar ao longo da fita de DNA (HINGORANI, 2016; CHAKRABORTY, ALANI, 2016) e promover o recrutamento de MutL α para o local da incompatibilidade (GRADIA et al., 1999; SELMANE et al., 2003; MAZUR, MENDILLO, KOLODNER, 2006).

O heterodímero MutL α , constituído pelas proteínas MLH1 e PMS2 também possui seu mecanismo de ação dirigido por ATP. A função do heterodímero MutL α é iniciar e conduzir a ressíntese de DNA. No domínio N-terminal do complexo MutL α está localizado o sítio com atividade ATPase. A ligação a ATP ao domínio N-terminal promove a dimerização entre MLH1 e PMS2, e a prévia sinalização do DNA contendo o erro favorece a interação com o MutS α . Já o domínio C-terminal do complexo contém atividade de endonuclease, responsável por clivar a fita de DNA que contém o mal pareamento (KADYROV et al., 2006; GUENEAU et al., 2013; GUARNE, CHARBONNIER, 2015). Esta função é análoga a MutH de organismos procariotos. A função da endonuclease latente em MutL α de eucariotos é estimulada por MutS α mas possui sua função ativada e direcionada pelo Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA, do inglês: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), que por sua vez é carregado pelo Fator de Replicação C (RFC, do inglês: *Replication Factor C*) (KADYROV et al., 2006; PLUCIENNIK et al., 2010; JEON et al., 2016). Por fim, as polimerases de DNA Pol δ ou Pol ϵ , restauram a síntese do trecho que foi excisado e a DNA ligase promove a ligação entre as extremidades dos filamentos recém sintetizados.

Em eucariotos, a natureza descontínua e fragmentada de replicação da fita *lagging* em fragmentos de Okazaki é que estabelece a distinção entre a fita molde e a fita nascente de DNA para que o mecanismo de reparo atue de modo preciso. Na ausência de um sinal

que discrimine, o reparo pode ocorrer em qualquer uma das duas fitas, seja ela a montada corretamente, que corresponde a fita molde ou a fita recém sintetizada, que de fato possui o erro de pareamento. Logo, há apenas 50% de chance que o pareamento incorreto seja reparado e isso não fornecerá nenhum grande aumento da manutenção da fidelidade do genoma (LIU, KEIJERZ, RASMUSSEN, 2017). Uma vez direcionada qual é a fita nascente, o reparo do tipo MMR de eucariotos também é de grande precisão.

Outros heterodímeros parecem exercer função no *mismatch repair* eucarioto. O complexo MutS β , formado pelas proteínas MSH2 e MSH3, possui aparente redundância funcional a MutS α , ligando-se a erros de mal pareamento e iniciando o processo de reparo. No entanto, enquanto MutS α é responsável por detectar *indels* relativamente menores, MutS β identifica relativamente maiores (JIRICNY, 2013). Já o papel dos complexos MutL β , formado pelas proteínas MLH1 e PMS1; e MutL γ , formado pelas proteínas MLH1 e MLH3 ainda é bastante discutido. É provável que a atividade destes dois complexos depende principalmente da atividade exercida pelo heterodímero MutL α . MutL γ parece ter ação compensatória quando há a ausência de MutL α na célula (REYES et al., 2015; PEĆINA-ŠLAUS et al, 2020). O mesmo não pode ser dito de MutL β , cuja função não é bem elucidada.

1.3.2.4 Fenótipo

Os indivíduos portadores da síndrome de Lynch possuem uma variante germinativa monoalélica de caráter patogênico em um dos quatro principais genes do sistema MMR. Tais mutações conferem uma alta predisposição para o desenvolvimento de tumores principalmente colorretais e de endométrio, mas o espectro tumoral da síndrome é bastante amplo e confere um risco significativo para outros tumores extracolônicos, como os de intestino delgado, estômago, sistema hepatobiliar, trato urológico superior, cérebro, pele e ovário. É sugestivo que outras neoplasias também façam parte do conjunto de tumores da síndrome de Lynch, tais como neoplasias de mama, tumores de próstata, de pâncreas e sarcomas, mas as estimativas de risco são inconclusivas e o envolvimento da mesma com estes tipos tumorais ainda permanece incerto (BARROW et al., 2009; KASTRINOS et al., 2009; URSO et al., 2012; LU, DANIELS, 2013; HARKNESS et al., 2015).

Uma série de evidências apontam que, para determinadas neoplasias, há uma íntima relação com qual gene encontra-se mutado. Por exemplo, um maior risco para cânceres ginecológicos, em especial o de endométrio é observado em portadores de

variantes patogênicas em *MSH6*, enquanto que o risco de câncer colorretal parece ser substancialmente menor em indivíduos com mutações patogênicas neste gene quando comparado com o risco associado a variantes patogênicas em *MLH1* e *MSH2* por sua vez, que confere uma alta penetrância não só para câncer colorretal, mas também para tumores de endométrio e de ovário. Variantes patogênicas em *MSH2* também estão associadas a um maior risco de câncer do trato urinário superior, trato gastrointestinal superior, cérebro e próstata (BARROW et al., 2009; HARKNESS et al., 2015; JOOST et al., 2015; THERKILDSEN et al., 2015; DOMINGUEZ-VALENTIN et al., 2020). Variantes patogênicas em *PMS2* por sua vez são cada vez mais discutidas quanto a penetrância, uma vez que achados recentes tem indicado um aumento não significativo no risco de câncer nos portadores (DOMINGUEZ-VALENTIN et al., 2020). Outros fatores parecem modular o risco para todos os achados tumorais na síndrome de Lynch, tais como o sexo, a idade, outros eventos genéticos, obesidade, atividade física, tabagismo e dieta (WATSON et al., 2008; BARROW et al., 2009; VAN DUIJNHOFEN et al., 2013; MOVAHEDI et al., 2015).

Clinicamente, os indivíduos acometidos possuem uma idade precoce quando diagnosticados (entre 40-50 anos de idade), uma alta probabilidade de desenvolver tumores múltiplos e de ocorrência bilateral quando a neoplasia é de órgãos pares; histórico familiar com um número considerável de membros afetados e em todas as gerações, atendendo aos critérios mendelianos de doença autossômica dominante. Além disso, apresentam os marcadores moleculares de microssatélites instáveis e a perda de expressão do gene mutado. Essas características são observadas em aproximadamente 90% dos tumores associados à síndrome de Lynch (LYNCH; CHAPELLE, 2003; LIPTON et al., 2004; VASEN et al., 2007; GUARINOS et al., 2010).

Nesse contexto, o câncer de ovário é a segunda neoplasia ginecológica mais comum em mulheres portadoras de síndrome de Lynch, sendo o risco de desenvolver alguma neoplasia epitelial de ovário ao longo da vida moderadamente alta, por volta de 9 a 12%, mas significativamente maior do que o risco médio populacional, que em geral é de 1,3% (BONADONA et al., 2011; KUZNIA, ROETT, 2015).

1.4 Abordagem diagnóstica

1.4.1 Critérios clínicos e patológicos

O histórico familiar e pessoal de câncer, bem como o tumor em questão, sua histologia e a idade ao diagnóstico são os fortes indicativos para que se investigue ou não

uma síndrome de predisposição ao câncer como a síndrome de Lynch. Para melhor nortear a identificação dos portadores, ao longo da história de descobertas desta patologia, critérios de diagnóstico foram sendo criados. Os critérios de Amsterdam I, criados em clínicos 1991 pelos esforços do Grupo Internacional Colaborativo em HNPCC possui um foco em indivíduos com forte histórico familiar de câncer colorretal, em uma idade jovem ao diagnóstico e cuja possibilidade de Polipose Familiar Adenomatosa tenha sido devidamente excluída (VASEN et al., 1991). Estes critérios também são tidos clinicamente como a regra de “três, dois, um”, uma vez que pelo ou menos três familiares devem ter câncer colorretal, duas gerações consecutivas devem ser afetadas e onde um dos afetados deve ser parente em primeiro grau de um dos outros dois. Estes critérios podem ser consultados de forma mais detalhada na Tabela 1.

À medida que os tumores extracolônicos foram sendo observados e descritos, no ano de 1999, fruto de uma revisão dos primeiros critérios de Amsterdam e tendo em vista a necessidade considerar a ocorrência destes tumores extracolônicos, o Grupo Internacional Colaborativo em HNPCC reformulou seus primeiros critérios e criou os critérios de Amsterdam II. De semelhante modo aos critérios de Amsterdam I, estes também estabeleciam o diagnóstico da síndrome com base em manifestações clínicas. Sabe-se hoje que metade das famílias que atendem a esses critérios têm uma variante patogênica no gene MMR (BARNETSON et al., 2006; VASEN et al., 1999) (Tabela 2).

Tabela 1 - Critérios de Amsterdam I

Todos os critérios devem ser preenchidos para o correto diagnóstico clínico de síndrome de Lynch

1. Pelo ou menos três familiares devem ter câncer colorretal verificado histologicamente.
2. Um deve ser parente em primeiro grau dos os outros dois.
3. Pelo menos duas gerações sucessivas devem ser afetadas.
4. Ao menos um dos casos de câncer colorretal deve ter sido diagnosticado antes dos 50 anos.
5. Deve ser excluída a possibilidade de Polipose Adenomatosa Familiar.

Tabela 1: Critérios de Amsterdam I. Fonte: Vasen et al., 1991.

Tabela 2 - Critérios de Amsterdam II

Todos os critérios devem ser preenchidos para o correto diagnóstico clínico de síndrome de Lynch

1. Pelo ou menos três familiares devem ter câncer colorretal verificado histologicamente **OU** um acometido de um tumor dentro do espectro tumoral da síndrome (endométrio, intestino delgado, ureter e pelve renal)*
2. Um deve ser parente em primeiro grau dos os outros dois
3. Pelo menos duas gerações sucessivas devem ser afetadas.
4. Ao menos um dos casos de câncer colorretal deve ter sido diagnosticado antes dos 50 anos
5. Deve ser excluída a possibilidade de Polipose Adenomatosa Familiar

Tabela 1: Critérios de Amsterdam II. Fonte: Vasen et al., 1999.

*Os tumores citados fazem parte da primeira descrição de tumores extracolônicos que foram incluídos aos critérios de Amsterdam II. Posteriormente, outros tumores foram sendo associados e as evidências robustas o suficiente para ampliar o espectro da síndrome, incluindo os tumores de estômago, de pele, de bexiga e os tumores ovarianos.

Com a descoberta da instabilidade de microssatélites como um fenótipo tumoral da síndrome de Lynch e os novos conhecimentos sobre as características clínico-patológicas e moleculares que foram sendo acumulados desde os critérios de Amsterdam II, o Instituto Nacional do Câncer dos EUA, por meio da Conferência internacional sobre HNPCC, desenvolveu as diretrizes de Bethesda, cuja triagem partia da seleção clínica de carcinomas colorretais que justificassem o teste de instabilidade de microssatélites (MSI). Por fim, as Diretrizes de Bethesda revisadas, fornecem recomendações não só a seleção clínica de casos mas também para a avaliação molecular dos tumores juntamente com DNA de linhagem germinativa para a identificação da Síndrome de Lynch e inclui a normativa do painel consenso para terminação do status MSI. Nessa revisão também foi alterada a idade considerada para alguns critérios, bem como a inclusão de um espectro de tumores bem mais amplo.

A inclusão do teste para determinar a instabilidade de microssatélites faz das Diretrizes de Bethesda mais sensíveis quanto a identificação de indivíduos com grande probabilidade de serem portadores da Síndrome de Lynch pois, uma vez que a instabilidade de microssatélites é o forte indicador diagnóstico para Síndrome de Lynch. Estima-se que 72%-82% dos indivíduos que possuem câncer colorretal e preenchem as Diretrizes de Bethesda revisadas são de fato portadores da síndrome de Lynch (GOLOGAN et al., 2005; HAMPEL et al., 2008). Estas características clínicas e os achados moleculares até então fecham a série de recomendações de triagem para a Síndrome de Lynch.

Tabela 3 - Diretrizes de Bethesda

Ao menos um critério deve ser preenchido para o correto diagnóstico de síndrome de Lynch

1. Indivíduos que preencham os critérios de Amsterdam I
2. Indivíduos com dois tumores relacionados a síndrome de Lynch*, incluindo tumores colorretais ou extra-colônicos, que sejam sincrônicos ou metacrônicos
3. Indivíduos com câncer colorretal e com parente de primeiro grau também acometido por câncer colorretal, ou um câncer extra-colônico relacionados a síndrome de Lynch*, ou um adenoma colorretal, com um destes cânceres diagnosticados em idade inferior a 50 anos e o adenoma diagnosticado em idade inferior aos 40 anos;
4. Indivíduos com câncer colorretal ou câncer de endométrio diagnosticado em idade inferior aos 45 anos
5. Indivíduos com câncer colorretal localizado em cólon direito, com um padrão indiferenciado (sólido, cribriforme) ao exame histológico em idade ao diagnóstico inferior a 45 anos
6. Câncer colorretal com células em anel de sinete em idade inferior a 45 anos;
7. Adenoma colorretal em idade inferior aos 40 anos.

*Os tumores que estão originalmente associados ao espectro da síndrome de Lynch de acordo com as diretrizes de Bethesda revisadas são: endometrial, ovariano, gástrico, do trato hepatobiliar, câncer de intestino delgado, carcinoma de células transicionais da pelve renal ou do ureter. Fonte: Rodriguez-Bigas et al., 1997.

Tabela 4 - Diretrizes de Bethesda revisadas

Ao menos um critério deve ser preenchido para o correto diagnóstico clínico de síndrome de Lynch

1. Indivíduo com câncer colorretal diagnosticado com idade inferior aos 50 anos
2. Indivíduo com câncer colorretal ou com um câncer extra-colônico associado a síndrome de Lynch*, sincrônicos ou metacrônicos independentemente da idade ao diagnóstico
3. Indivíduo com câncer colorretal verificado histologicamente possuindo **alta instabilidade de microssatélites (MSI-H)**, com idade ao diagnóstico inferior aos 60 anos
4. Indivíduo com câncer colorretal, com um ou mais familiares em primeiro grau também acometidos por câncer colorretal ou tumores extracolônicos relacionados a síndrome de Lynch*, sendo um deles diagnosticado com idade inferior aos 50 anos
5. Indivíduo com câncer colorretal, com dois ou mais familiares também acometidos por câncer colorretal ou tumores extracolônicos relacionados a síndrome de Lynch*, independentemente da idade ao diagnóstico

*Os tumores que estão associados ao espectro da síndrome de Lynch e estão inclusos nas diretrizes de Bethesda revisadas são: câncer colorretal, endometrial, ovariano, pancreático, de ureter e de pelve renal, do trato biliar, de estômago, de cérebro (normalmente glioblastoma), adenomas de glândulas sebáceas e queratoacantomas e de intestino delgado. Fonte: Umar et al., 2004.

No entanto, mesmo considerando os tumores extracolônicos, o enfoque que tanto os critérios de Amsterdam II quando as Diretrizes revisadas de Bethesda possuem são para tumores colorretais, e mesmo dentro deste contexto, apresentam baixa sensibilidade. Desse modo, visando contemplar critérios que melhor se aplicassem para tumores ginecológicos, a Sociedade de Oncologia Ginecológica vem atualizando desde 2007 uma série de critérios de clínicos de triagem que sejam mais efetivos à tumores ginecológicos. Os critérios da Sociedade Americana de Oncologia Ginecológica (SGO, do inglês, *Society of Gynecologic Oncology*) de 2015 fornecem orientação para a triagem de pacientes que possuem maior probabilidade de ter uma predisposição hereditária para câncer de mama de ovário, de tuba uterina e de peritônio, devendo portanto receber aconselhamento genético e aos quais o testes genéticos devem ser oferecido (Tabela 5).

Tabela 5 - Critérios da Sociedade de Oncologia Ginecológica sobre a avaliação de risco para predisposições herdadas ao câncer ginecológico

O preenchimento de um dos critérios já é indicativo para a avaliação de risco
<ul style="list-style-type: none"> • Mulheres com câncer epitelial de ovário, tubário ou peritoneal de alto grau • Mulheres com câncer de mama antes dos 45 anos de idade • Mulheres com câncer de mama com algum parente próximo* também acometido com câncer de mama antes dos 50 anos • Mulheres com câncer de mama com algum parente próximo* acometido por câncer epitelial ovariano/ tubário/ peritoneal em qualquer idade • Mulheres com câncer de mama abaixo dos 50 anos e com história familiar limitada • Mulheres com câncer de mama com pelo ou menos dois parentes próximos* também acometidos com câncer de mama em qualquer idade • Mulheres com câncer de mama com pelo ou menos dois parentes próximos* acometidos com câncer de pancreático ou com câncer de próstata agressivo (pontuação de Gleason ≥ 7)*** • Mulheres com câncer dois tumores de mama primários, sendo o primeiro diagnosticado antes dos 50 anos de idade • Mulheres com câncer de mama triplo negativo abaixo dos 60 anos • Mulheres com câncer de mama e ascendência judia Ashkenazi • Mulheres com câncer pancreático com pelo ou menos dois dos parentes próximos* acometidos com câncer de mama, ovário, tuba uterina, peritoneal, pancreático ou de próstata agressivo (pontuação de Gleason ≥ 7)***
<p>MULHERES NÃO AFETADAS PELO CÂNCER, mas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Possui parente de primeiro grau ou vários parentes próximos que atendam a um dos critérios acima • Possui um parente próximo portador de mutação em <i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i> conhecida

- Possui um parente próximo com câncer de mama masculino

Tabela 5 - Critérios da Sociedade de Oncologia Ginecológica sobre a avaliação de risco para predisposições herdadas ao câncer ginecológico. * Parente próximo é definido como parentes de primeiro grau (pai, irmão, prole), parentes de segundo grau (avô, neto, tio, tia, sobrinho, sobrinha, meio-irmão) ou parentes de terceiro grau (primo-irmão, bisavô ou bisneto)** História familiar limitada corresponde a possuir menos de dois parentes do sexo feminino de primeiro ou de segundo grau ou ausência de parentes do sexo feminino sobrevivendo além de 45 anos. *** A pontuação de Gleason corresponde a um score conferido ao câncer de próstata com base em sua aparência histológica. Scores mais altos estão relacionados a tumores agressivos e com prognóstico adverso. Fonte: Lancaster, et al., 2015.

Apesar dos critérios de triagem estabelecidos pela Sociedade de Oncologia Ginecológica serem específicos para tumores ginecológicos, semelhante aos critérios de Amsterdam e as diretrizes de Bethesda, muitos deles partem de outros tumores e por isso são potencialmente pouco sensíveis para a triagem de indivíduos portadores da síndrome de Lynch à partir da associação com câncer de ovário. Tendo isso em vista, outros métodos de triagem tem sido apresentados e a triagem universal dos tumores, proposto pela rede de centros oncológicos americanos, o NCCN (National Comprehensive Cancer Network) (NCCN, 2017), é indicada para todos os indivíduos recém diagnosticados com câncer colorretal ou endometrial como estratégia primária para o rastreamento da síndrome de Lynch. No entanto, a abordagem tem sido empregada cada vez mais em estudos onde se busca elucidar a associação da síndrome de Lynch com outros tipos de tumores (JU et al., 2018; ABRHA et al., 2020).

1.4.2 Triagem universal dos tumores

É sabido que a perda de expressão de pelo ou menos uma das quatro principais proteínas envolvidas no *mismatch repair* e a instabilidade de *loci* de microssatélites são marcas distintivas para tumores da síndrome de Lynch. Logo, o emprego da imunohistoquímica para verificar a expressão das proteínas do sistema MMR, aliada a avaliação da instabilidade de microssatélites determinam o estado de proficiência do sistema MMR. Ainda, a análise de metilação da região promotora de *MLH1* é realizada para que se anule a possibilidade de que a ausência de expressão desta proteína não seja em decorrência de um evento esporádico, o que ocorre em aproximadamente 10% dos casos onde não há mutação nos genes MMR mas os tumores são deficientes em *MLH1* (LYNCH et al., 2015; BRUEGL et al., 2017). Por meio da utilização das duas técnicas em conjunto consegue-se identificar tumores que são deficientes para o sistema de reparo

MMR com grande propriedade quando comparado aos critérios de Bethesda no que diz respeito ao indicativo de indivíduos potencialmente portadores da síndrome de Lynch.

Nesse contexto, a triagem universal dos tumores consiste em um método de rastreio para a síndrome de Lynch onde se fornece a testagem da imuno-histoquímica e da análise de microssatélites para todos os indivíduos recém diagnosticados, a priori, com câncer colorretal e endometrial. Essa não seleção prévia dos casos de tumores que possam ser alvos da abordagem de triagem universal, eleva a sensibilidade à muito próximo dos 100% na identificação de indivíduos portadores da síndrome de Lynch, uma vez que é determinado o estado de proficiência do sistema MMR para todos os indivíduos acometidos pelos dois tipos tumorais mais incidentes no universo amostral da síndrome (MVUNDURA, et al., 2010; PEREZ-CARBONELL et al., 2012; ADAR et al., 2018). No entanto, diante do custo-benefício favorável e da alta sensibilidade, diversos estudos tem expandido a recomendação e empregado a triagem universal dos tumores para o amplo espectro tumoral que pode estar associado a síndrome de Lynch, em especial para aqueles com literatura consolidada a respeito, como é o caso das neoplasias epiteliais de ovário (HELDER- WOOLDERINK et al., 2016; RYAN et al., 2017; WOOLDERINK et al., 2018), uma vez que tumores ginecológicos em portadoras da síndrome de Lynch são frequentes e em cerca de 50% dos casos, um carcinoma endometrial ou ovariano é o “câncer sentinela” (LU et al., 2004; LU, DANIELS, 2013).

1.4.3 Imunohistoquímica

Em condições normais, os heterodímeros de reparo MutSa, formado pelas proteínas MLH1 e PMS2, e MutLa, formados pela proteínas MSH6 e MSH2 desempenham sua função associados ao processo de replicação, localizando e mediando a correção de bases mal pareadas, respectivamente. A inatividade por motivo que seja de qualquer uma destas proteínas é danosa ao *mismatch repair*. Em especial, a ausência de MLH1 e MSH2 inativa todo o heterodímero e compromete esta via de reparo de DNA devido a inexistência de outras proteínas que possam associar-se a PMS2 e MSH6 e formar um dímero de reparo alternativo (BELLIZZI; FRANKEL, 2009). Diante disso, ser capaz de identificar a inexpressão destas proteínas é um importante passo para determinar potenciais tumores que são decorrentes da deficiência no sistema de reparo por mal pareamento de bases e indicativo de síndrome de Lynch.

Explorando o princípio da ligação antígeno anticorpo, a imunohistoquímica é considerada um teste de triagem inicial para a síndrome de Lynch por possuir alta

sensibilidade, bom custo benefício, aplicabilidade rápida, execução de baixa complexidade e, na maioria dos casos, com análises demonstrando clara presença ou ausência de coloração dos núcleos celulares, definindo a status de expressão das proteínas envolvidas. Diante disso, é um método de rotina bem aceito que apresenta valor tanto diagnóstico quanto prognóstico, uma vez que a detecção da presença ou ausência de expressão das quatro proteínas consegue primariamente fechar um diagnóstico e direcionar a intervenção terapêutica do paciente.

Considera-se expressa a proteína MMR quando na reação tissular, todas as células tumorais são positivas, bem como as células do controle interno positivo, que consiste em alguma célula normal ou porcentagem destas com expressão retida. Quando as quatro proteínas do sistema MMR estão intactas, devidamente expressas tanto no tecido tumoral quanto no tecido normal, classifica-se o tumor como proficiente no sistema de reparo MMR. A ausência de expressão no tumor é considerada quando há ausência de coloração em todas as células tumorais, contanto que uma célula do controle interno seja positiva. Quando pelo ou menos uma das quatro principais proteínas envolvidas na via de reparo por mal pareamento de bases do DNA tem expressão ausente, considera-se que o tumor é deficiente no sistema de reparo MMR (SARODE, ROBINSON, 2019). Ao determinar a proteína não expressa, também se prediz qual o gene do sistema é potencialmente afetado por um evento mutacional, direcionando a análise molecular (BUZA; ZIAI; HUI, 2016).

No entanto, algumas variáveis podem fazer com que a interpretação dos resultados seja limitada. A principal delas é a fixação do tecido, em geral feita em formaldeído no caso em biópsias embebidas em parafina e fixadas em formalina. Esse tipo de fixação pode causar perda de imunorreatividade ou por mascarar ou por danificar os epítomos de ligação ao anticorpo, tornando a marcação fraca ou inexistente (WERNER et al., 2000). Por isso, a segunda principal variável é a etapa de recuperação antigênica, cuja eficiência dita em muito a qualidade da reação de imunohistoquímica. Áreas de necrose associada a amostra tumoral, a qualidade dos anticorpos no que diz respeito a sua sensibilidade e marcação específica e a própria variabilidade na análise podem interferir na sensibilidade e especificidade da técnica, tornando o resultado passível a erro (RAMOS-VARA, 2005; SHIA, 2008; KLARSKOV et al., 2010). Diante disso, o uso de uma outra técnica que venha a endossar os resultados é preferível e, nesse caso, a análise da instabilidade de microsatélites, por se tratar de uma técnica molecular, apresenta maior sensibilidade em

detectar tumores deficientes do sistema MMR minimiza o impacto das variáveis de perda de imunorreatividade e análise humana passível à erros.

1.4.4 Instabilidade de microssatélites

Os microssatélites, ou STRs (do inglês *Simple Tandem Repeats*) são unidades de repetição muito frequentes e distribuídas aleatoriamente por todo o genoma eucarioto. Os primeiros estudos datam à década de 70, sendo realizados em bacteriófagos e foi observado que estas regiões genômicas são *hotspots* para mutações do tipo frameshift (FARABAUGH et al., 1978). Posteriormente, também foi observado que mutações nos genes *MSH2*, *PMS2* e *MLH1* em *Saccharomyces cerevisiae* elevou a instabilidade nas regiões de microssatélite de 100-700 vezes (STRAND et al., 1993) e, ainda na era clínica da Síndrome de Lynch, foi observado que em tumores que atendiam aos critérios de Amsterdam I, possuíam instabilidade de microssatélites (AALTONEN et al., 1993; IONOV et al. 1993; THIBODEAU; BREN; SCHAID, 1993) sendo este o grande marco para a era molecular da síndrome de Lynch.

Durante o processo de replicação, devido à natureza repetitiva das regiões de microssatélite, a fita molde a fita nascente podem sofrer um deslizamento, também chamado de *slippage*, resultando em um pareamento incorreto entre ambas, formando um *loop* (KORNBERG et al., 1964). Nem sempre os *loops* formados pelo deslizamento, ou os eventos de inserções e deleções em regiões de microssatélites culminam em mutações. Em parte são corrigidos pela própria atividade exonucleotídica da DNA polimerase ou pelo mecanismo de reparo do tipo MMR (EISEN, 1999). Logo, ineficiência do sistema de reparo por malpareamento além de promover a não correção do dano, causando uma expansão ou deleção destes STR, torna estas regiões do genoma ainda mais propensas a erros durante o processo de replicação, culminando na instabilidade de microssatélites (YAMADA et al., 2002). Este fenótipo tumoral hipermutado é uma característica observada na maioria dos tumores relacionados à síndrome de Lynch e um marcador da deficiência do sistema MMR, sendo encontrado em apenas uma pequena fração dos tumores esporádicos (KASTRINOS; STOFFEL, 2014).

Considerando a descoberta da instabilidade de microssatélites em tumores da síndrome de Lynch, em 1998 a Conferência internacional sobre HNPCC promovida pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos compila as Diretrizes de Bethesda, onde consideram um painel consenso com cinco marcadores de microssatélites: o BAT-25 e o BAT-26, que correspondem a marcadores de unidade de repetição mononucleotídica e

D2S123, D5S346 e D17S250 são marcadores de unidade de repetição dinucleotídica (BOLAND et al., 1998).

De acordo com o número de marcadores instáveis, as diretrizes de Bethesda estabelecem três classificações para a instabilidade de microssatélites. A alta instabilidade de microssatélites (MSI-H, do inglês, *Microsatellite Instability - High*) é estabelecida quando pelo ou menos dois dos cinco marcadores apresentam-se instáveis. Em painéis maiores, se estabelece que quando há uma porcentagem acima de 30% dos marcadores de *loci* de microssatélite instáveis, tem-se esta mesma classificação. A instabilidade de microssatélites baixa (MSI-L, do inglês, *Microsatellite Instability - Low*) é definida quando apenas um dos cinco marcadores é instável ou, em painéis maiores, quando uma porcentagem menor que 30% apresentam instabilidade. Quando nenhum dos marcadores do painel se apresentam instáveis, se estabelece a estabilidade de microssatélites (MSS, do inglês, *Microsatellite Stable*). Apesar de não haver um consenso, muitos autores tem explorado a biológica e a importância clínico patológica dos tumores que apresentam baixa instabilidade de microssatélites, a investigação destes pode ser informativa sobre mecanismos fundamentais da tumorigênese e fornecer achados interessantes, o que nos faz explorar estes tumores como uma categoria distinta dos MSS (TOMLINSON et al., 2002; HALFORD et al., 2003).

Estudos posteriores ao consenso estabelecido pelas diretrizes de Bethesda quanto ao painel avaliativo da instabilidade de microssatélites, tem considerado que marcadores de repetição de dinucleotídeos possuem baixa sensibilidade e especificidade na detecção da deficiência do sistema MMR quando comparados com marcadores de repetição de mononucleotídeos, que também tendem a ser estáveis e normomórficos (UMAR et al., 2004), o que em termos de análise é bastante útil quando se tem a correspondência do o tecido normal. Este mesmo estudo de 2004 recomendou um novo painel contendo cinco marcadores de repetição de mononucleotídicas para análise de microssatélites: BAT25, BAT-26, NR-21, NR-24 e NR-27.

Para a detecção da instabilidade de microssatélites realiza-se a técnica da Reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), onde a região de interesse no genoma é franqueada pelo par de primer correspondente e inúmeras cópias são geradas por sucessivos ciclos de desnaturação, anelamento e amplificação. O status MSI é determinado pela diferença de tamanho entre os fragmentos obtidos quando comparado o DNA normal, cuja fonte pode ser qualquer outro tecido e DNA tumoral do mesmo indivíduo. Desde o estabelecimento da técnica de PCR e da instabilidade de

microsatélites, houve intensa otimização do meio de detecção. Atualmente, *primers* fluorescentes são utilizados no processo de amplificação e a eletroforese capilar no processo de detecção.

Embora a indicação para triagem da síndrome de Lynch com o uso em conjunto das duas técnicas seja para casos de tumores colorretais e endometriais, a demanda de triagem partindo-se de outras manifestações tumorais tem tornado amplo o uso da abordagem universal dos tumores.

1.4.5 Análise de metilação da região promotora de *MLH1*

A metilação de DNA é um dos mecanismo epigenético mais bem estudado, sendo reconhecidamente um mecanismo de silenciamento gênico. Este evento está envolvido com uma série de manifestações clínicas, tais como síndromes genéticas e o câncer devido a influência direta sob a ativação ou inibição da expressão gênica. (EGGER et al., 2004; SHARMA; KELLY; JONES, 2010). As ilhas CpGs, caracterizadas por citosinas seguida de guaninas são o alvo do processo de metilação. Estes locais do genoma possuem aproximadamente 500 bases e destas, aproximadamente 55% são CGs, localizadas na porção 5' do gene (TAKAI; JONES, 2002). A adição de um radical metil no carbono 5 de uma base citosina, mediado por enzimas metiltransferases (DNMTs) constitui então o processo de metilação (PAULSEN; FERGUSON-SMITH, 2001).

Estima-se que 50-70% de todas as regiões de promotores gênicos em humanos possuem regiões de ilha CpGs (WANG; LEUNG, 2004; SAXONOV; BERG; BRUTLAG, 2006). Logo, para que um genes seja transcricionalmente ativos, estas regiões devem estar devidamente possuem desmetiladas. Em contra partida, um aumento na metilação das regiões promotoras constitui um meio clássico pelo qual a metilação pode atuar na repressão gênica. O processo de metilação do promotor impede o acesso dos fatores de transcrição e conseqüentemente provoca a inibição da cascata de transcrição gênica, silenciando a expressão do gene em questão (PRENDERGAST; LAWE; ZIFF, 1991; MIRANDA; JONES, 2007; SEPULVEDA et al., 2009).

Embora não seja o meio clássico pelo qual a síndrome de Lynch se manifesta, a hipermetilação da região promotora de *MLH1* é observada em uma frequência de 10-50% dos casos de neoplasias epiteliais de ovário (STRATHDEE et al., 1999; STRATHDEE et al., 2001; GEISLER et al., 2003; SHILPA et al., 2014). A frequência deste evento epigenético pode ser alterado de acordo com o subtipo histológico em questão. Por constituir um evento esporádico, a análise da metilação da região promotora do gene

MLH1 é importante para a devida exclusão da amostra no caso de segmento com a investigação de mutações germinativas associadas aos genes da síndrome de Lynch. (SIMPKINS et al., 1999; WHELAN et al., 2002; BRUEGL et al., 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Embora as portadoras da síndrome de Lynch possuam um risco cumulativo de desenvolver câncer de ovário em torno de 9-12% (GRINDEDAL et al., 2010), e as neoplasias ovarianas estejam associadas a um alto índice de mortalidade, estudos visando elucidar a associação existente entre tumores ovarianos e a deficiência do sistema de reparo por mal pareamento de DNA são limitados (WATSON et al., 2008; BENNETT et al., 2016). No Brasil, diferentemente do que ocorre com os casos de câncer de cólon, reto e endométrio, onde a associação com a síndrome de Lynch é bem estabelecida e há estudos relacionados (SILVA et al., 2015, ROSA et al., 2020), não há nenhum estudo sobre a frequência de tumores ovarianos deficientes do sistema de reparo por mal pareamento, não havendo evidência alguma sobre a incidência de tumores ovarianos potencialmente relacionados a síndrome de Lynch na população brasileira.

Diante disto, a abordagem de triagem universal dos tumores é uma ferramenta sensível e útil, além de maximizar o diagnóstico quando comparado a aplicação tão somente de critérios clínicos para casos de neoplasias ovarianas potencialmente associadas a síndrome de Lynch. O diagnóstico preciso abre um leque de possibilidades quanto a vigilância não só das pacientes quanto a possível ocorrência de outros tumores compreendidos no espectro da síndrome, mas também fornece a opção de rastreio aos familiares, reduzindo a morbidade e a mortalidade associada. Quanto ao tratamento, tumores com deficiência na atividade do sistema MMR podem se beneficiar de conduta terapêutica diferenciada e isto tem forte influência sobre o prognóstico (HAUSE et al., 2016; COLLE et al., 2017; LIBERA et al., 2017; BURGESS; KOLESAR, 2018). Também, é dada a opção de aconselhamento genético e intervenção preventiva, opção última a ser analisada caso a caso, ao que chamamos de medicina personalizada, mas que devem ser opções proporcionadas a paciente. Por fim, uma boa estratégia diagnóstica é importante no contexto de elaboração e implementação de políticas públicas em saúde da mulher.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Caracterizar uma casuística brasileira composta por neoplasias epiteliais de ovário quanto à proficiência do sistema de reparo de pareamento incorreto de DNA.

3.2 Objetivos específicos:

- Caracterizar casos de tumores epiteliais de ovário quanto às características clínicas e histopatológicas.
- Avaliar a expressão das proteínas *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* em tumores epiteliais de ovário.
- Avaliar o *status* de instabilidade de microssatélites em todos os tumores epiteliais de ovário que perfazem a casuística
- Investigar a ocorrência de metilação na região promotora do gene *MLH1* em tumores onde não houver a expressão da 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

Perfazem a casuística 75 casos de neoplasias epiteliais de ovário, cujas amostras encontravam-se fixadas em formalina e embebidas em blocos de parafina, armazenadas no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (SERPAT-HCRP-USP). Foram considerados os seguintes critérios de inclusão: Os tumores deveriam corresponder a neoplasias epiteliais primárias de ovário, armazenadas durante o período de 01/01/2008 a 01/01/2019, onde em prontuário clínico as pacientes não tivessem histórico de quimioterapia neoadjuvante.

4.2 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sob o parecer de número 3.474.017, com concessão da devida dispensa de aplicação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para utilização do material tumoral disponível e armazenado no SERPAT-HCRP.

4.3 Caracterização clínico-patológica

Os dados clínicos e histopatológico dos casos de neoplasias epiteliais de ovário utilizados neste trabalho foram obtidos através da revisão de prontuários e laudos anátomo-patológicos. O estadiamento patológico dos tumores de endométrio foi obtido seguindo o disposto pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO, do inglês - *International Federation of Gynecology and Obstetrics*) de 2018 (BEREK et al, 2018) e pela Organização Mundial da Saúde (2014).

4.4 Caracterização molecular da proficiência do sistema MMR

4.4.1 Análise de expressão das proteínas do MMR

A análise de expressão das quatro principais proteínas da via MMR: MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 foram realizadas através da imuno-histoquímica (IHQ) em amostras de todas as neoplasias epiteliais de ovário que foram selecionadas para compor a casuística. Para otimizar as reações, a cada 23 amostras foi construído um único bloco de parafina contendo fragmentos cilíndricos das amostras tumorais mais um controle, que

consiste em uma amostra de fígado, constituindo o que é denominado de matriz de amostras teciduais (TMA, do inglês, *tissue micro-array*). (KONONEN et al., 1998).

Lâminas de HE correspondentes a cada caso foram revisadas por dois médicos patologistas (A.R.S e F.C.) pertencentes ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) a fim de delimitar uma área significativamente representativa de células neoplásicas para cada amostra tumoral. Esta marcação foi utilizada para a construção dos blocos de TMA; por sua vez construídos utilizando o equipamento tissue micro-array builder (Histopathology, Ltd., Akác u. 8.,7632, Pécs, Hungary, Baranya) conforme ilustrado na figura 1.

Os blocos de parafina receptores foram construídos 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. Após solidificados e finalizados, foi realizada a extração de tecido dos blocos doadores com o auxílio de um extrator do tipo punch dentro da área previamente delimitada pelo patologista como área de maior representatividade tumoral para aquele caso. Um amostra de tecido hepático foi inclusa na primeira posição à esquerda de cada bloco receptor para possibilitar a correta orientação das amostras nos blocos receptores e um mapa foi criado a fim de descrever a correta localização e identificação de cada amostra (Figura 1).

Figura 1 – Construção dos blocos de microarranjos teciduais



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

Com o uso de um micrótomo, corte histológicos de 4 μ m de espessura foram confeccionados para cada um dos blocos de TMA e aplicados sobre lâminas de vidro silanizadas a 8%. Para as proteínas MLH1 e PMS2 foi realizado o seguinte protocolo experimental:

- 1- Para a desparafinização dos cortes histológicos, as lâminas obtidas a partir dos blocos de TMA foram colocadas em estufa à 37°C em overnight.
- 2- Posteriormente, 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 TRIS-EDTA (pH=9,0) (Target retrieveal solution high 1:50) em banho Maria de 96-98°C por 40 minutos.
- 5- Finalizado o período de recuperação antigênica, as lâminas foram retiradas do banho maria e permaneceram em temperatura ambiente por 20 minutos, ainda mergulhadas em tampão tris-EDTA.
- 6- Para remover o tampão de recuperação antigênica, as lâminas foram lavadas com tampão PBS (pH= 7,6) por duas vezes, com duração de 3 minutos cada.
- 7- Posteriormente, o entorno de cada um dos cortes histológicos nas lâminas foi delimitado com caneta hidrofóbica.
- 8- O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado adicionando-se 100 µL do reagente Hydrogen Peroxidase Block (Spring Biscience, Pleasanton, CA, EUA) sobre cada corte por 10-15 minutos.
- 9- Para finalizar o bloqueio da peroxidase endógena, o reagente foi removido e os cortes sobre as lâminas 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. Foram utilizadas duas lâminas derivadas de cada bloco de TMA, sendo cada uma incubada com um anticorpo primário diferente e em apresentação de prontos para uso. As especificações dos anticorpos para a reação de IHQ de MLH1 e PMS2 podem ser consultados na tabela 5.
- 11- Após o período de incubação, os anticorpos primários foram removidos dos cortes histológicos e foram aplicados dois banhos com tampão TBST (pH= 7,6) por duas vezes, com duração de 10 minutos cada.
- 12- Em seguida, foi aplicado 100 µL do DAKO EnVision FLEX/HRP que consiste em um conjugado de anticorpo com polímero. O reagente permaneceu sobre os cortes histológicos por 30 minutos e foi removido em seguida.

- 13- O reagente DAKO EnVision FLEX/HRP foi então removido e as lâminas histológicas passaram por dois banhos com tampão TBST (pH= 7,6) por duas vezes, com duração de 10 minutos cada.
- 14- Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de DAB (3,3'-Diaminobenzidina) na proporção de 1:50 (50 µL de DAB para cada 1000 µL do reagente DAB Substrate – DAKO), em cada lâmina histológica, por um minuto. A reação de oxidação do substrato cromogênico pela enzima HRP gerou precipitados com tonalidade amarronzada, que foram utilizados para as posteriores análises em microscópio óptico de luz.
- 15- Após o período de exposição ao DAB, as lâminas foram imediatamente mergulhadas em água destilada para interromper a reação de oxidação do substrato cromogênico.
- 16- 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.
- 17- 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.
- 18- 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.
- 19- 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).

Para as reações de IHQ das proteínas MSH6 e MSH2, foi realizado o seguinte protocolo:

- 1- As lâminas obtidas a partir dos blocos de TMA foram colocadas em estufa à 65-68°C overnight para dar início ao processo de desparafinização.
- 2- No dia seguinte, as lâminas foram mergulhadas em xilol (três vezes por 6 minutos cada) para finalizar o processo de desparafinização.

- 3- Para hidratação dos tecidos, as lâminas foram passadas em uma série de álcoois (100%, 90% e 80%, respectivamente e por 1 minuto em cada álcool), em seguida lavadas em água destilada por um minuto mergulhadas na cuba de tampão desejada.
- 4- Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica por calor em panela a vapor por 40 minutos.
MSH6: EDTA 8.4pH
MSH2: Tris-EDTA 9.5pH
- 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 seus respectivos tampões.
- 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. Depois o PBS foi aspirado e a lâmina não foi lavada.
- 10- As lâminas foram incubadas por 1 hora com os anticorpos primários, cujas especificações podem ser consultadas na tabela 5.
- 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.
- 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 10 minutos.

- 14- O reagente REVEAL HRP Conjugate foi então removido e as lâminas histológicas passaram em tampão PBS (pH= 7,6) por três 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)
- 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).

Tabela 6 - Anticorpos primários utilizados nas reações de imuno-histoquímica

Anticorpo	Fabricante	Clone	Organismo	Diluição
Anti-MLH1	Dako	ES05	Camundongo	Pronto para uso
Anti-MSH2	Dako	Fe11	Camundongo	1:150
Anti-MSH6	Dako	E31	Camundongo	1:200
Anti-PMS2	Dako	EP51	Camundongo	Pronto para uso

4.4.2 Extração de DNA

Para a etapa de extração de DNA, de cada bloco doador de amostra ao TMA foram confeccionadas aproximadamente cinco lâminas, sendo os cortes em 4µm de espessura realizados com o auxílio de um micrótomo. A representativa área de células tumorais, anteriormente identificada por um patologista, foi removida das lâminas de vidro com o auxílio de lâminas do tipo bisturi cirúrgico. O mesmo foi realizado para extração de DNA normal quando houve disponibilidade deste material e a possibilidade de recuperação destes no SERPAT-HCRP. Para extração automatizada do DNA, foi-se utilizado kits de extração Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV (Promega, Madison – WI, EUA) e o equipamento Maxwell Rapid Sample Concentrator (Promega), de acordo com o seguinte protocolo:

- 1- Cada amostra de tecido extraída das lâminas foi acondicionadas em tubos do tipo Eppendorf de volume 1,5 mL;
- 2- 180 µL do tampão de incubação e 20 µL de solução de Proteinase K (20 mg/mL) foram adicionados em cada tubo. Ambos os reagentes são fornecidos pelo kit de extração e foram utilizados de acordo com o manual do fabricante.
- 3- As amostras seguiram incubadas em banho-maria à 70 °C por um período de no mínimo 2 horas e no máximo 16 horas;
- 4- Após o período de incubação, 400 µL do tampão de lise foi adicionado a cada tubo de do tipo Eppendorf contendo as amostras;
- 5- Após adicionado o tampão de lise, os tubos Eppendorfs foram *vortexzados* por aproximadamente 10 segundos e posteriormente centrifugados.
- 6- Em seguida, a amostra contida em cada eppendorf foi adicionado a um cartucho de extração de DNA, fornecido pelo kit de extração e de acordo com as especificações fornecidas pelo fabricante.
- 7- De acordo com o fornecido pelo kit de extração e seguindo as especificações fornecidas pelo fabricante foram realizadas as extrações automatizadas de DNA.
- 8- Por fim, as amostras foram analisadas quanto às suas respectivas quantidade e pureza em espectrofotômetro do tipo NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Uma razão de absorbância de luz entre os comprimentos de onda 260nm e 280nm igual ou superior a 1,8 foi utilizada como parâmetro para considerar a amostra livre de impurezas.

4.4.3 Instabilidade de microssatélites

As reações de instabilidade de microssatélites foram realizada para todos os tumores por meio da análise do padrão de amplificação dos seguintes marcadores: NR-27, NS-21, NR-24, BAT-25 e BAT-26. Os primers utilizados nesta reação possuem temperatura de anelamento semelhante e os fragmentos gerados tamanhos distintos. Por isso, foi possível a realização de uma PCR multiplex, que consiste em uma reação de PCR em que várias regiões diferentes do DNA são amplificadas ao mesmo tempo (ROSSETI; SILVA; RODRIGUES, 2006). Para correta identificação, cada um dos primers foi marcado com fluorescência, de acordo com o proposto por Buhard et al (2004). As características de marcadores e primers utilizados na reação de amplificação encontram-se na tabela 7.

Tabela 7 - Características dos marcadores microssatélites e dos respectivos *primers* utilizados para geração dos *amplicons*

Marcador	Localização gênica	Repetição	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho em pb
NR-27	5'UTR	26 adeninas	5'-AACCATGCTTGCAAACCACT-3' 5'-CGATAATACTAGCAATGACC-3'	90
NR-21	5'UTR	25 Timinas	5'-GAGTCGCTGGCACAGTTCTA-3' 5'-CTGGTCACTCGCGTTTACAA-3'	110
NR-24	3'UTR	24 Timinas	5'-GCTGAATTTTACCTCCTGAC-3' 5'-ATTGTGCCATTGCATTCCAA-3'	129
BAT-25	Íntron 16	21 Timinas	5'-TACCAGGTGGCAAAGGGCA-3' 5'- TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3'	152
BAT-26	Íntron 5	27 adeninas	5'-CTGCGGTAATCAAGTTTTTATAG-3' 5'-AACCATTCAACATTTTAAACCC-3'	182

Os reagentes utilizados, suas concentrações e quantidades, bem como as condições de ciclagem são descritas nas tabelas 8 e 9, a seguir:

Tabela 8 - Descrição dos reagentes utilizados nas reações de PCR multiplex

Reagentes	Volumes (µL)	Concentração final (25 µL/reação)
H2O	11,4	-
10x PCR <i>Buffer</i>	2,5	1x
2mM dNTP Mix	2,5	0,2mM de cada

50mM MgCl ₂	1,0	1,5Mm
<i>Primer</i> NR-27 F	0,35	0,14 μ M
<i>Primer</i> NR-27 R	0,35	0,14 μ M
<i>Primer</i> NR-21 F	0,35	0,14 μ M
<i>Primer</i> NR-21 R	0,35	0,14 μ M
<i>Primer</i> NR-24 F	0,50	0,20 μ M
<i>Primer</i> NR-24 R	0,50	0,20 μ M
<i>Primer</i> BAT-25 F	0,50	0,20 μ M
<i>Primer</i> BAT-25 R	0,50	0,20 μ M
<i>Primer</i> BAT-26 F	1,00	0,40 μ M
<i>Primer</i> BAT-26 R	1,00	0,40 μ M
Platinum Taq DNA Polimerase	0,2	4,0 unidades/reacção
DNA (30 ng/ μ L)	2,00	60ng

Tabela 9 - 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 obtidos foi realizada em eletroforese capilar através do equipamento ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e os resultados foram interpretados por meio do software GeneMarker versão 2.2.0 (SoftGenetics LLC). A instabilidade de microssatélites foi definida quando observado um padrão de amplificação a partir do DNA tumoral apresentando alelos distintos do visualizado na respectiva amostra de DNA não tumoral. Assim, a alta instabilidade de microssatélites (MSI-H) foi definida quando dois ou mais marcadores apresentavam um padrão instável de amplificação; quando apenas um marcador apresentou instabilidade, estes casos foram classificados como possuindo uma baixa instabilidade de microssatélite (MSI-L) e, quando nenhum dos marcadores apresentou instabilidade trata-se de um caso de tumor estável (MSS).

4.4.4. Metilação da região promotora do gene *MLH1*

As amostras de DNA foram tratadas com bissulfite de sódio, usando o kit Epitect Bisulfite kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. Uma concentração de 1500 ng de DNA de cada amostra, foi utilizado para as reações de conversão. Uma PCR específica de metilação (MSP, do inglês, *Methylation Specific PCR*), foi realizada para detectar a metilação do DNA tratado com o bissulfite de sódio da seguinte forma: Dois pares de *primers* diferentes são empregados na amplificação de uma mesma região gênica, seguindo o utilizado por Park et al. (2003) e descrito na tabela 10. O bissulfite de sódio converte citosinas não metiladas em uracila, de modo um par de primers é desenhado para amplificar a região apenas se a mesma possuir citosinas metiladas antes do tratamento com bissulfite de sódio e o segundo par de primer, por sua vez, só amplificará essa região se não houver metilação das citosinas antes do processo de tratamento com o bissulfite de sódio.

Tabela 10 - *Primers* utilizados para análise de metilação do promotor do gene *MLH1*

Primer	Sequência	Tamanho do <i>amplicon</i> em pares de bases
<i>Forward</i> metilado	5' -GATAGCGATTTTAAACGC-3'	92
<i>Reverse</i> metilado	5' -TCTATAAATTACTAAATCTCTTCG-3'	
<i>Forward</i> metilado	5' -AGAGTGGATAGTGATTTTAAATGT-3'	90
<i>Reverse</i> metilado	5' -ACTCTATAAATTACTAAATCTCTTCA-3'	

Os *primers* foram marcados com 6-fluorescein amidite (6-FAM), sendo os *amplicons* observados de coloração azul. Os reagentes utilizados 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). Para controle da reação e ateste da especificidade dos primers quanto à amplificação da região de interesse dependente do seu estado de metilação, foram utilizados dois DNA comerciais, sendo um totalmente metilado e o outro DNA totalmente desmetilado.

Tabela 11 – Descrição dos reagentes utilizados nas reações de MSP-PCR

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>Primer Forward</i>	0,5	0,2 μM
<i>Primer Reverse</i>	0,5	0,2 μM
Platinum Taq DNA Polimerase	0,125	2,5 unidades/reação
DNA (30 ng/ μL)	2,0	100ng

Tabela 12- Programa de ciclagem utilizada para obtenção dos amplicons pela técnica de MSP-PCR

Estágio	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	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

Uma amostra não tratada com bissulfito de sódio também foi utilizada em cada reação ateste da especificidade dos primers quanto à amplificação exclusiva de DNA tratado com bissulfito de sódio. Também, foi incluída em cada reação de MSP uma reação sem a adição de DNA template, para verificar uma possível contaminação das reações. Todas essas reações foram realizadas em duplicata. A presença de um pico na posição de 90 pares de base indica a presença de metilação na amostra analisada. Uma vez verificada a metilação no promotor do gene MLH1, estes tumores foram considerados casos esporádicos de câncer de ovário.

4.5 Classificação molecular dos tumores

A partir dos resultados da IHQ, os tumores que apresentaram a perda de expressão de ao menos uma das quatro proteínas do sistema MMR (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2) foram classificados como tumores deficientes quanto a atividade do sistema de reparo do

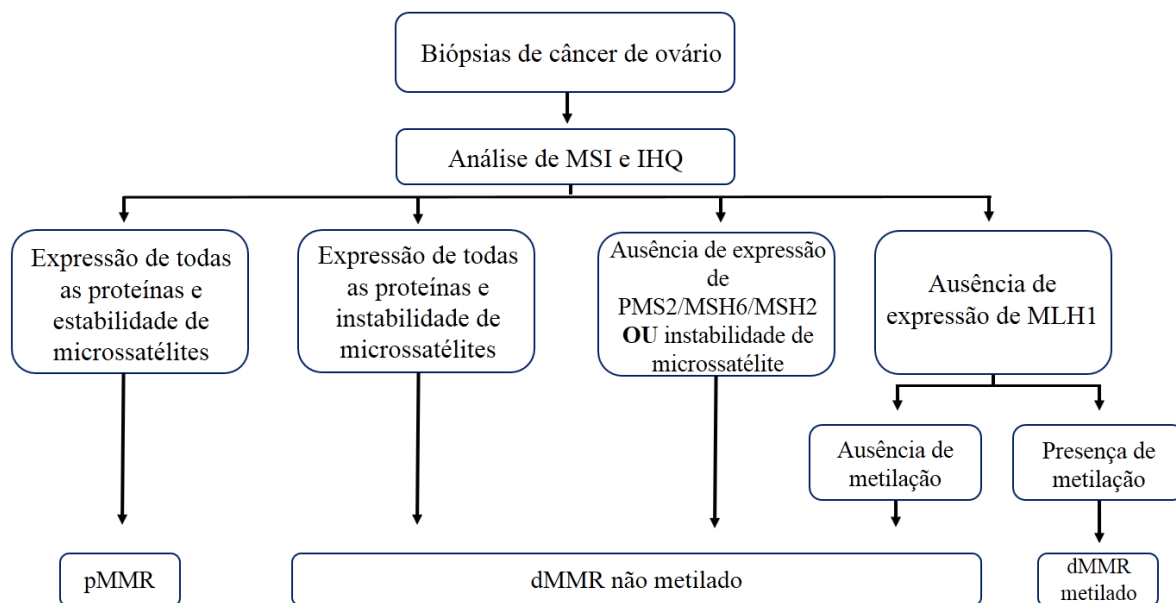
mismatch repair (dMMR); o contrário, quando a expressão de todas as proteínas foi lida como intacta, tratam-se de tumores proficiência quanto a atividade do sistema de reparo do MMR (pMMR). De semelhante modo quanto à instabilidade de microssatélites, os tumores MSI-H foram classificados como tumores deficientes quanto a atividade do sistema de reparo do *mismatch repair* (dMMR) e, os casos classificados como MSS ou MSI-L foram classificados como proficientes quanto a atividade do sistema de reparo do *mismatch repair* (dMMR).

A análise de metilação da região promotora do gene *MLH1* não se fez necessária uma vez que todos os tumores desta casuística apresentaram imunocoloração positiva para o respectivo produto proteico.

4.6 Fluxograma das etapas metodológicas

O fluxograma apresentado na Figura 2 mostra todas as etapas metodológicas e a ordem de execução de cada uma delas.

Figura 2 – Fluxograma das etapas metodológicas



Legenda: (MSI) instabilidade de microssatélites. (IHQ) imuno-histoquímica. (pMMR) tumores epiteliais de ovário proficientes na atividade do sistema MMR. (dMMR Não-metilado) tumores epiteliais de ovário deficientes na atividade do sistema MMR, sem metilação na região promotora do gene *MLH1*. (dMMR) tumores epiteliais de ovário deficientes na atividade do sistema MMR. Fonte: A autora.

4.7 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram descritas considerando-se as frequências absolutas e relativas, sendo a frequência relativa. Para verificar se há diferença significativa entre a formação de grupos histológicos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância fixado em 5%. Para avaliar a viabilidade das amostras foi realizado um teste de Qui-quadrado agrupando as amostras em diferentes conjuntos de anos (Grupo 1: amostras de 2008-2013 e 2014-2018; Grupo 2: amostras de 2008-2010, 2011-2013, 2014-2016 e 2017-2018) e com nível de significância fixado em 5%. As análises foram realizadas através do software Statistica 10.0 e o SPSS 4.0.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização clínico-patológica da casuística

Um total de setenta e cinco casos de neoplasias ovarianas de origem epitelial perfazem esta casuística. A média de idade ao diagnóstico observada foi de 50,4 anos, variando entre 23 e 81 anos. Em sua maioria, as pacientes possuíam idade superior aos 50 anos (49,33%), sendo 26,67% (20/75) com idade entre 50 e 59 anos e 24% (18/75) com idade superior aos 60 anos. Foi possível obter informações sobre a histopatologia de 69 tumores. Destes, 52/75 (75,36%) tumores apresentaram grau FIGO I e II, sendo os demais casos apresentando grau FIGO III e IV. Também foi possível determinar o estadiamento patológico de 69 dos 75 casos sendo observado a maioria dos casos distribuídos entre os estadiamentos I e II (75,36%, 52/75). Dados detalhados das características clínico-patológicas da casuística podem ser consultados na tabela 13.

Tabela 13. Características clínico-patológicas da casuística

Característica	N	%
Idade ao diagnóstico:	75	100
		50,4
Média (desvio padrão)		(13,19)
Mediana (mínimo - máximo)	50 (20-81)	
< 50 anos	37	49,33
Entre 50 e 59 anos	20	26,67
≥ 60 anos	18	24,00
Grau (FIGO):	69	100
I	42	60,87
II	10	14,49
III	16	23,19
IV	1	1,45
Estadiamento patológico (FIGO):	69	100
I	2	2,90
IA	21	30,44
IB	5	7,25
IC	6	8,70
IC2	7	10,14
IC3	1	1,45
II	1	1,45
IIA	4	5,78
IIB	5	7,25
III	6	8,70
IIIA1	1	1,45

IIIA2	1	1,45
IIIB	1	1,45
IIIC	7	10,14
IV	1	1,45

Em relação a histologia das células tumorais (tabela 14), aproximadamente 50% dos casos são carcinomas serosos. Os demais casos correspondem a carcinomas de células claras, carcinomas mucinosos, adenocarcinomas não especificados (NOS, do inglês: *non-specific adenocarcinoma*) e tumores do tipo Borderline, sendo este último subtipo histológico formado por 10 casos de histologia serosa, 8 casos de histologia mucinosa e um tumor sero-mucinoso. Com relação ao estadiamento tumoral, foi possível estabelecê-lo para 69/75 dos tumores. Destes, mais da metade dos casos correspondem ao estadiamento tumoral mais inicial da doença, o grau FIGO I (42/79; 60,88%). O segundo nível de estadiamento corresponde a ao grau FIGO III, com 23,19% (16/79). Os demais casos estão contidos em estadiamento grau FIGO II, com 14,48% (10/69) e grau FIGO IV, com apenas um caso (1,45%).

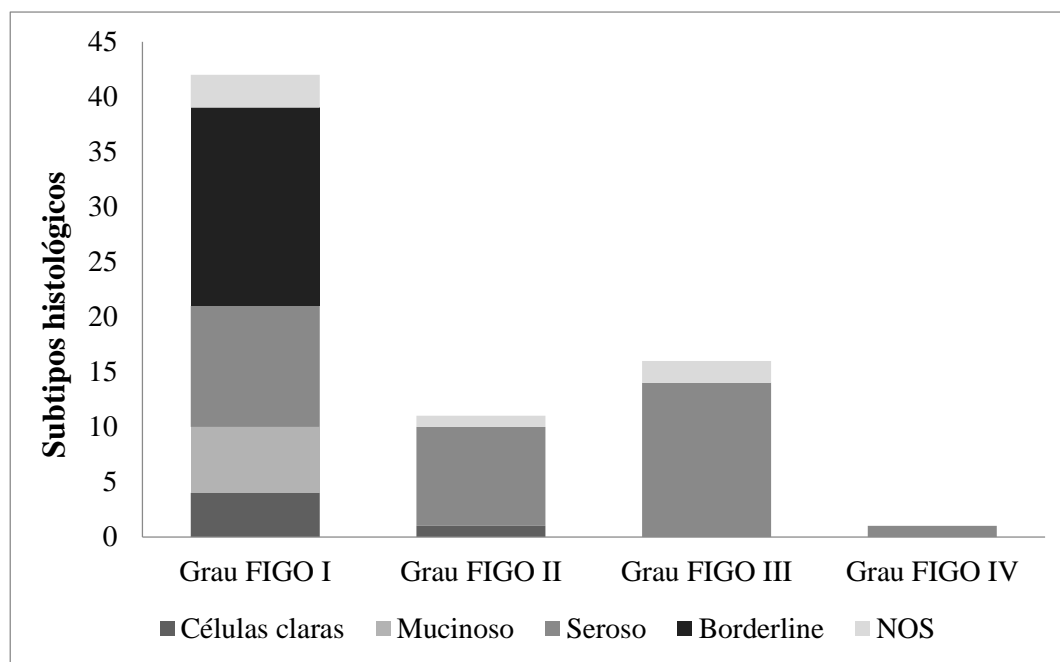
Tabela 14. Subtipos histológicos dos tumores epiteliais de ovário da casuística

Subtipos histológicos	N	%
Células claras	5	6,66
Mucinoso	9	12,00
Seroso	36	48,00
Borderline	19	25,33
Adenocarcinoma de ovário não especificado	6	8,00
TOTAL	75	100

Quanto a contribuição dos subtipos histológicos com a formação de cada grupo de estadiamento tumoral grau FIGO e para verificar se há uma diferença entre os grupos estatisticamente significativa, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis (p -valor = 0,029), indicando que os grupos são diferentes entre si devido a proporção de tumores Borderline no grupo de estadiamento grau FIGO I e de tumores serosos no grupo de estadiamento grau FIGO IV. De fato, é possível observar que os tumores em estadiamento grau FIGO II, III IV, possuem uma representação predominante de tumores de subtipo histológico seroso (Grau FIGO II: 9/11 serosos, 1/11 células claras e 1/11 NOS); (Grau FIGO III: 14/16 serosos e 2/16 NOS); (Grau FIGO IV: 1/1 seroso), enquanto que os tumores em

estadiamento grau FIGO I possuem uma predominante contribuição do subtipo histológico Borderline, responsável por 42,85% do total (18/42), seguido pela contribuição de tumores serosos (11/42, 26,19%), tumores mucinosos (6/42), tumores de células claras (4/42) e adenocarcinomas não especificados (3/42) (Figura 4).

Figura 3 – Contribuição dos subtipos histológicos na formação dos grupos de estadiamento tumoral grau FIGO.

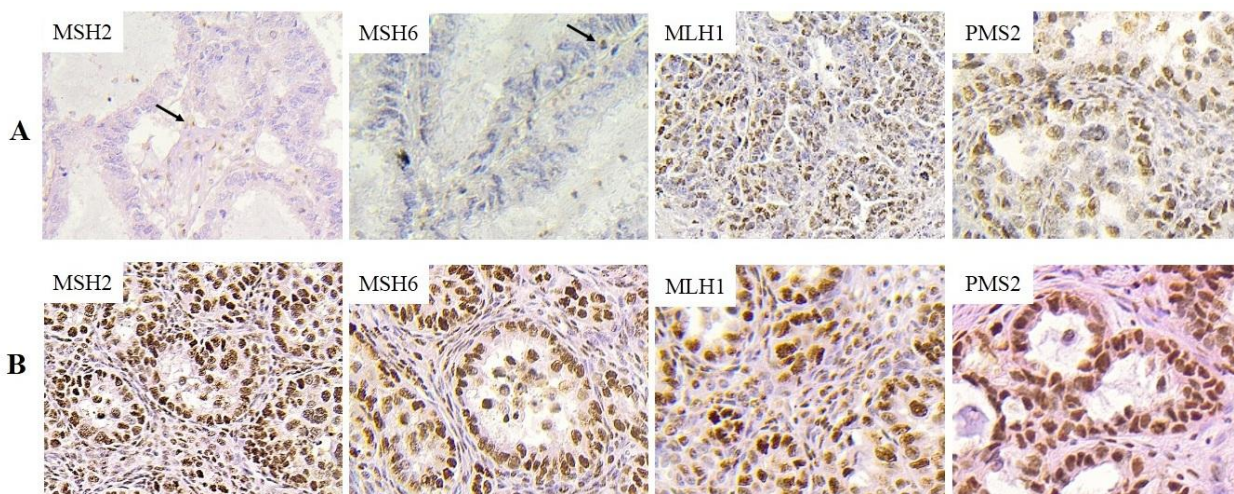


5.2 Caracterização molecular da casuística

5.2.1 Imuno-histoquímica

Dos 75 tumores, um caso (1/75; 1,33%) apresentou resultados de IHQ com perda de expressão para duas das quatro proteínas avaliadas, MSH2 e MSH6, com o devido controle interno positivo, sendo este caso caracterizado como dMMR (Figura 1). Os demais tumores apresentaram resultados de imunorreatividade positiva para todas as proteínas da via MMR, sendo assim caracterizados como tumores pMMR. Os resultados das reações de IHQ para as proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 estão apresentados na Tabela 4. Exemplos das reações de IHQ são mostrados na Figura 4.

Figura 4 – Reações de imuno-histoquímica das proteínas MSH2, MSH6, MLH1 e PMS2 em cortes histológicos de câncer epitelial de ovário

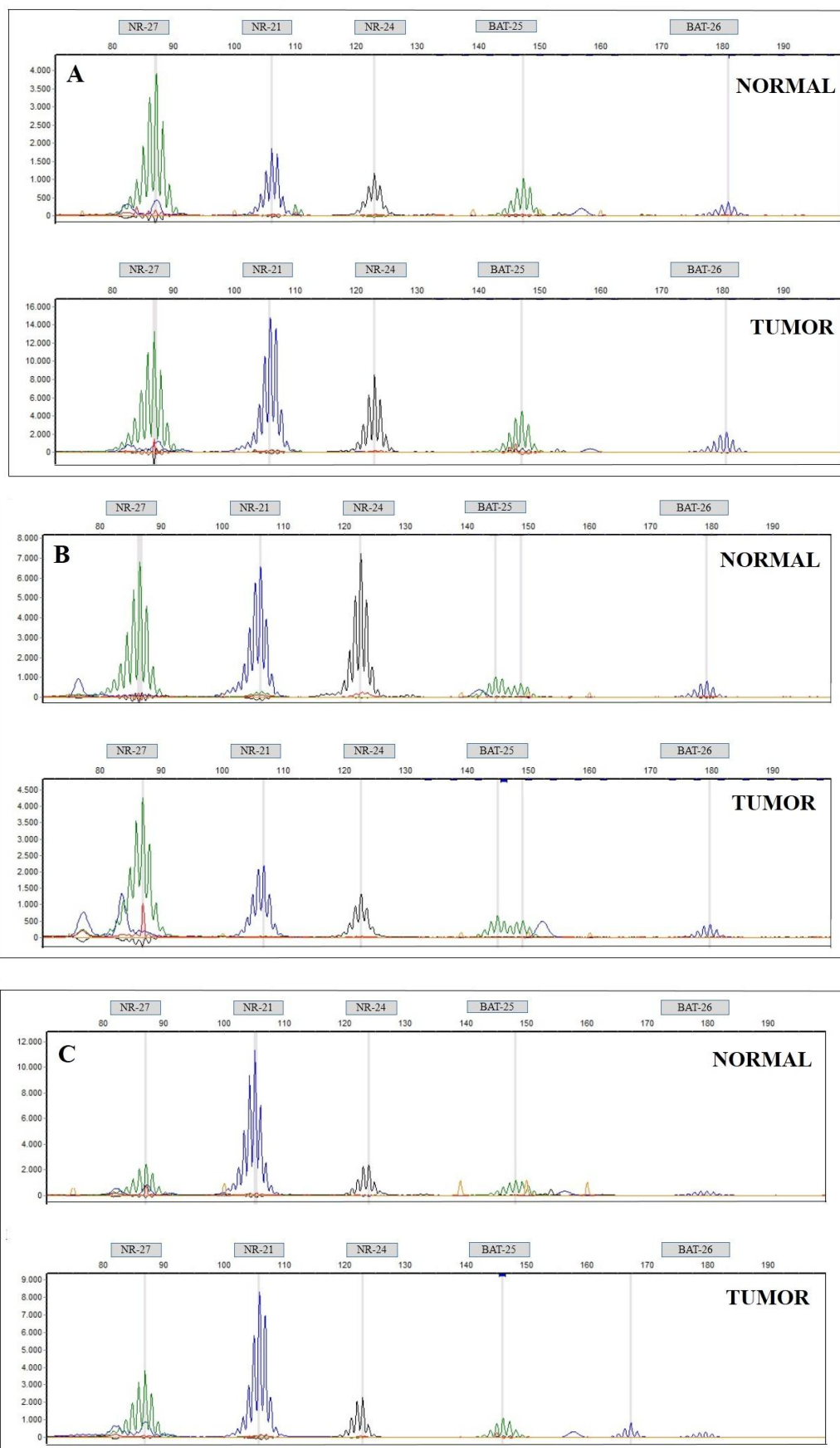


Legenda: Tumor negativo para a expressão de MSH2 e MSH6 (A) Tumor positivo para a expressão para as proteínas MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6 (B). Fonte: A autora (2021).

5.2.2 Instabilidade de microssatélites

Para todas as biópsias de tumor que compõem esta casuística foram realizadas as reações de instabilidade de microssatélite. Diante de uma limitação metodológica em conseguir DNA não tumoral suficiente e/ou viável para o pareamento das reações, foi possível definir o status da instabilidade de microssatélites por esta metodologia para 40% dos casos (30/75). Destes, cinco casos são MSI-L, havendo alteração no perfil de expressão alélico entre as reações pareadas em um dos cinco *loci* de microssatélite. Os demais 25 casos são característicos de MSS, onde nestes foram identificados cinco polimorfismos. Eletroferogramas referentes à alguns dos tumores caracterizados podem ser encontrados na figura 5.

Figura 5 - Eletroferogramas referentes às análises de instabilidade de microsatélites em amostras de tumores epiteliais de ovário.



Legenda: Eletroferogramas de tumores caracterizado como MSS (A) polimorfismo, que também caracteriza-se como MSS (B) e MSI-L (C). O eletroferograma identificado como “tumor”, refere-se à amplificação dos marcadores de microssatélites gerados a partir de DNA extraído de tecido tumoral, enquanto o eletroferograma identificado como “normal” refere-se ao padrão de amplificação dos marcadores microssatélites a partir de DNA extraído de tecido não 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. Os picos sem barras horizontais são artefatos das reações de PCR e não representam alelos verdadeiros, também denominados de picos *stutters*.

Para o total de 45 casos onde não foi possível parear as reações obtidas através de tecido tumoral e não tumoral, a análise da instabilidade de microssatélite foi realizada através da metodologia de Campanella et al. (2014), que consiste em uma faixa de variação quase monomórfica (QMRV) pré-estabelecida da população brasileira para o mesmo painel de repetição de mononucleotídeos que foi aplicado à esta casuística (tabela 15). 17,7% dos casos analisados através do QMRV (8/45) são MSI-L. Os demais 37 tumores possuem todos os loci de microssatélites dentro da faixa de variação utilizada e são classificados como MSS. Logo, por meio da análise de instabilidade de microssatélites, todos os casos tratam-se de tumores proficientes do sistema MMR (pMMR) (Tabela 16).

Tabela 15 - Definição da instabilidade de microssatélite através do QMRV

	NR-27	NR-21	NR-24	BAT- 25	BAT-26
QMRV Campanella e colaboradores, 2014					
	82-88pb	101-107pb	119-125pb	142-148pb	174-180pb
p_10346/16	86.4	105.2	122.6	145.8	178.0
p_10637/15	86.1	106.1	122.9	146.6	179.9
p_10888/10	85.4	106.2	122.6	145.7	166.9 178.2
p_10994/09	86.9	106.4	123.6	145.7	169.0 178.2
p_11339/18	86.0	105.8	122.6	143.1	179.8
p_11427/08	86.6	106.1	123.5	140.5 146.7	178.1
p_12115/10	85.9	106.0	123.0	147.2	178.7
p_12803/08	86.6	105.3	122.6	147.8	179.3
p_1285/13	86.5	105.5	123.6	146.7	179.2

p_13664/10	87.0	106.8	122.9	147.3	180.8
p_14167/18	86.5	105.3	122.7	146.7	170.0 179.2
p_14586/15	87.0	105.8	123.6	147.0	179.8
p_15043/11	87.1	105.8	122.8	146.2	179.8
p_15658/15	88.0	105.9	123.8	146.1	179.6
p_15744/17	87.0	105.9	122.7	146.3	167.4 179.7
p_16282/08	87.0	106.8	123.7	147.2	179.7
p_16563/08	87.2	105.9	122.9	148.3	179.8
p_16932/16	86.0	106.9	123.0	147.2	178.8
p_17712/15	87.0	105.9	122.9	147.1	179.7
p_17781/08	87.1	106.1	122.9	148.4	178.8
p_17963/18	87.1	106.0	123.9	147.3	179.9
p_18018/18	87.0	106.9	123.9	147.2	178.7
p_19142/09	86.9	104.9	123.6	147.2	178.6
p_19523/13	87.0	106.0	123.7	148.4	179.7
p_19599/10	86.6	105.4	123.6	147.8	179.2
p_19645/15	87.1	106.2	122.9	147.3	178.8
p_20205/18	85.9	106.0	122.9	147.3	178.7
p_20405/16	86.9	106.7	123.7	147.1	179.6
p_3956/15	87.0	106.8	123.7	147.2	179.7
p_3965/16	87.0	106.9	123.8	146.1	179.8
p_4466/10	87.1	105.9	122.7	147.2	180.7
p_5592/16	86.9	105.9	123.8	147.1	178.7
p_6292/15	87.0	102.3 105.8	123.6	147.3	178.6
p_6425/10	86.0	105.8	122.6	146.1	179.6
p_8602/15	86.0	105.9	122.7	147.1	179.7
p_9227/12	87.0	105.0	122.7	145.1	178.7
p_5776/15	87.0	105.0	122.7	145.1 148.3	178.7
p_2607/09	87.0	105.9	122.8	148.3	179.7
p_18629/08	86.0	105.3	122.0	147.1	179.7
p_14828/13	87.0	106.7	123.7	147.3	179.6
p_10055/12	87.0	105.0	122.6	147.2	179.8
p_9903/18	86.2	106.0	123.7	147.2	179.7
p_335/14	86.9	105.9	123.8	147.1	179.6
p_3433/12	87.0	105.9	123.0	145.1	167.3 179.6
p_7707/11	85.9	105.0	123.8	147.0	179.7

Tabela 16 - Resultados descritivos de IHQ, MSI e o status de proficiência do sistema MMR para cada tumor.

Câncer de ovário	IHQ				MSI Status	Status de proficiência do sistema MMR
	MLH1	PMS2	MSH6	MSH2		
p_17413/10	+	+	-	-	MSS*	dMMR
p_2355/12	+	+	+	+	MSI – L*	pMMR
p_3620/10	+	+	+	+	MSI – L*	pMMR
p_450/12	+	+	+	+	MSI – L*	pMMR
p_11633/09	+	+	+	+	MSI – L*	pMMR
p_10544/11	+	+	+	+	MSI – L*	pMMR
p_12683/13	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_20765/18	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_20623/16	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_16201/17	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_8246/09	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_5182/16	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_7519/10	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_18468/16	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_6287/14	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_7799/15	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_2732/11	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_7462/13	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_142/16	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_4228/12	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_4162/12	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_9960/13	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_11131/09	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_9090/11	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_4290/16	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_18330/15	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_2509/13	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_1442/18	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_14073/16	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_1297/16	+	+	+	+	MSS*	pMMR
p_17781/08	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_15658/15	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_17712/15	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_15043/11	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_10888/10	+	+	+	+	MSI-L**	pMMR
p_8602/15	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_6292/15	+	+	+	+	MSI-L**	pMMR

p_19142/09	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_19523/13	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_3956/15	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_16282/08	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_4466/10	+	+	+	+	MSI-L**	pMMR
p_17963/18	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_11339/18	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_6425/10	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_9227/12	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_13664/10	+	+	+	+	MSI-L**	pMMR
p_19645/15	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_5592/16	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_5776/15	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_14167/18	+	+	+	+	MSI-L**	pMMR
p_2607/09	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_12803/08	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_10994/09	+	+	+	+	MSI-L**	pMMR
p_18629/08	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_14828/13	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_10055/12	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_9903/18	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_16932/16	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_19599/10	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_16563/08	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_18018/18	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_3965/16	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_335/14	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_11427/08	+	+	+	+	MSI-L**	pMMR
p_3433/12	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_20405/16	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_10346/16	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_15744/17	+	+	+	+	MSI-L**	pMMR
p_14586/15	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_20205/18	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_12115/10	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_1285/13	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_7707/11	+	+	+	+	MSS**	pMMR
p_10637/15	+	+	+	+	MSS**	pMMR

Legenda: *Casos onde o status MSI foi definido por meio do pareamento entre as reações de DNA tumoral e DNA não tumoral. **Casos onde status MSI foi definido por meio da metodologia de Campanella et al., 2014.

Para verificar se há uma diferença entre os grupos estatisticamente significativa entre os anos em que as amostras foram viáveis para o teste de instabilidade de microssatélites em comparação com aquelas não viáveis, foi realizado o teste de Qui-quadrado. Para tanto, as amostras foram divididas em dois grupos de modo a diminuir o intervalo em anos em: Grupo 1, com amostras de 2008-2013 e 2014-2018, ou seja, amostras de 5 anos mais recentes em relação as demais; Grupo 2: amostras de 2008-2010, 2011-2013, 2014-2016 e 2017-2018, ou seja, amostras de 2 anos mais recentes em relação as demais. Os grupos não se diferenciam em relação as proporções observadas, visto que o p-valor se encontra acima do nível de significância de 5% adotado (p-valor = 0,637 e 4,095 respectivamente) (Tabela 17) concluindo-se ser aleatório entre os anos obter amostras de boa qualidade proveniente de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina para análise de instabilidade de microssatélites.

Tabela 17 - Frequência observada do teste de Qui-quadrado entre as amostras viáveis e não viáveis de 2008 a 2018

		Grupo 1		Grupo 2			
		Períodos		Períodos			
		2008- 2013	2014- 2018	2008- 2010	2011- 2013	2014- 2016	2017- 2018
Amostras não viáveis	Contagem	23	22	15	8	15	7
	% no período	57,50%	62,90%	33,3%	17,8%	33,3%	15,6%
Amostras viáveis	Contagem	17	13	6	11	10	3
	% no período	42,50%	37,10%	20,0%	36,7%	33,3%	10,0%
Total	Contagem	40	35	21	19	25	10
	% no período	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
p-valor = 0,637				p-valor = 4,095			

5.2.3 Análise de metilação

Todas as reações de IHQ apresentaram inequívoca reação de imunocoloração preservada para a proteína MLH1. Logo, não houve nenhuma amostra indicativa para proceder com análise de metilação da região promotora do gene *MLH1*.

6. DISCUSSÃO

Em termos de composição histológica desta casuística, é possível observar que 25,33% (19/75) é representada pelos tumores ovarianos do tipo Borderline. Os tumores do tipo Borderline, ou ainda denominados de carcinomas ovarianos limítrofes correspondem a aproximadamente 15% de todos os casos de neoplasias epiteliais de ovário (SKÍRNISDÓTTIR et al., 2008). Estes tumores ocorrem em uma variedade de histologias, sendo na maioria dos casos mais evidenciado em tumores de histologia serosa e mucinosa e menos representado por tumores epiteliais de ovário dos subtipos endometrióide, células claras ou do tipo Brenner (TRIMBLE, TRIMBLE, 2003; HARTER et al., 2014). Nos 19 casos de tumores Borderline que perfazem o N amostral, é possível notar essa predominância, sendo 10 casos de histologia serosa, 8 casos de histologia mucinosa e um tumor sero-mucinoso. Este é um grupo de tumores que merece especial atenção por seu comportamento biológico, pois apesar de apresentarem-se como tumores de crescimento lento e em geral indolentes, sem invasão estromal e com rara disseminação extra-ovariana, estes tumores possuem uma série de características semelhantes com as de tumores malignos, como a estratificação do revestimento epitelial das papilas, a atipia nuclear e a presença de atividade mitótica aumentada (GEZA, 2005; TRILLSCH et al., 2010; KURMAN, 2014; GERSHENSON, 2017). Logo, estes são tumores que não podem ser claramente definidos como benignos e sua evolução pode cursar à malignidade. Devido estas características histopatológicas, alguns estudos os têm incluído em suas amostragens quanto a investigações diversas.

Park e Kim (2014) ao estimar o risco de tumores ovarianos Borderline associados à Síndrome de Lynch ou HBOC – as duas principais síndromes de predisposição ao câncer hereditário de ovário - com base na triagem imuno-histoquímica, observaram que para aproximadamente 3% das pacientes pode ser necessário aconselhamento genético e testes confirmativos para elucidar a possível associação deste subtipo tumoral com a Síndrome de Lynch. Esta é uma associação pouco explorada, o que pode indicar que alguns tumores ovarianos associados a síndrome de Lynch podem deixar de ter seguimento por falta de evidências que endossem a investigação. No presente estudo, apesar da representatividade, nenhum caso de tumor ovariano Borderline foi considerado dMMR, não acrescentando ao cerne da discussão maiores informações.

Quanto a composição da casuística em termos de idade, houve uma representatividade de 49,3% abaixo dos 50 anos. Creditamos esta tendência na estrutura dos resultados clínico-patológicos à alta representatividade de tumores do tipo

Borderline. A média de idade das pacientes acometidas por tumores classificados como Borderline em nosso estudo é de 45 anos, confluyente com o descrito quanto aos casos de neoplasias ovarianas do tipo Borderline desenvolvem-se em mulheres jovens e por vezes décadas antes dos demais tumores epiteliais de ovário, por volta dos 40 anos de idade (SKÍRNISDÓTTIR et al., 2008; HARTER et al., 2014).

Também é possível que hajam casos associados a outras síndromes de predisposição ao câncer, uma vez que a notável característica de tumores associados a um background genético hereditário é o desenvolvimento precoce. Aqui destacamos não apenas a síndrome de Lynch, cujas pacientes que desenvolvem tumores ovarianos possuem em média 45 anos de idade, sendo quase 20 anos antes da idade onde os tumores ovarianos esporádicos costumam surgir, mas também HBOC, cuja média de idade ao diagnóstico é de 55 anos, e outras síndromes hereditárias de predisposição ao câncer que aumentam a ocorrência de câncer de ovário, como a Síndrome de Cowden, Síndrome de Peutz-Jeghers, Síndrome de Coffin-Siris, Li-Fraumeni, Muir-Torre e Anemia de Fanconi sendo estas últimas responsáveis por até 25% dos casos (PONTI, DE LEON, 2005; NETO, CUNHA, 2015; ERRICHELLO et al., 2017).

Em termos de estadiamento patológico, dos tumores que perfazem esta casuística aproximadamente 2/3 (75,4%) dos casos são representados por tumores em grau FIGO I e II, que correspondem aos estágios iniciais da progressão tumoral. Acreditamos que, novamente o enriquecimento de tumores do tipo Borderline nesta casuística tenha forte influência nesse padrão de distribuição. Aproximadamente 75% dos tumores ovarianos borderline são diagnosticados em estágio I, sendo o estadiamento mais avançado para este histotipo tumoral um evento mais raro. A classificação do estágio FIGO inicial também é para estes tumores um excelente fator prognóstico e indicativo de maior sobrevivência (TRILLSCH et al., 2010; ZAPARDIEL et al., 2010; FISCHEROVA et al., 2012; TROPÉ, KAERN, DAVIDSON; 2012). Em contrapartida, apenas cerca de 13% dos casos de carcinoma seroso de ovário são diagnosticados no estágio I ou estágio II. O rápido crescimento e disseminação tumoral faz com que mais frequentemente sejam diagnosticados em estágios mais avançados e com um prognóstico comprometido (NAROD, 2016; LISIO et al., 2019). Carcinomas serosos totalizam 32% do total de casos deste estudo, sendo eles os responsáveis pelo montante de casos em estadiamento tumoral grau III e IV.

Seis casos de adenocarcinomas não especificados fazem parte da nossa casuística, representando 8% no total de casos. Estes correspondem a um pequeno grupo de tumores

epiteliais de ovário com classificação pouco específica; seja por tratarem-se de tumores indiferenciados ou por não apresentarem os padrões arquitetônicos e as características citológicas evidentes dos subtipos comuns de carcinoma de ovário. Acredita-se que o número de tumores ovarianos assim classificados diminuirá à medida que melhores testes façam a correta atribuição do tipo de célula ao qual pertencem. Logo, uma vez que são tumores epiteliais de ovário e estavam disponíveis no SERPAT-HCRP-USP também foram incluídos nesta amostragem. Nenhum destes adenocarcinomas não especificados foram classificados como dMMR.

Quanto à proficiência do sistema de reparo MMR, as neoplasias epiteliais de ovário foram caracterizadas através da realização das técnicas de imunohistoquímica e de instabilidade de microssatélites para todos os tumores. A análise de metilação da região promotora de *MLH1* não foi necessária uma vez que nenhum dos casos apresentou imunohistoquímica negativa para *MLH1*. A ausência de expressão de ao menos uma das quatro proteínas da via MMR foi observada em apenas um caso (1/75), representando 1,33% desta casuística. Trata-se de uma paciente de idade ao diagnóstico aos 33 anos, acometida por um carcinoma ovariano de células claras que apresenta a perda de expressão concomitante de *MSH2/MSH6*. O estadiamento patológico corresponde a grau FIGO IIB e a sobrevida da paciente foi confirmada como acima dos 60 meses.

Em observância a literatura, o câncer de ovário associado a deficiência no sistema MMR de fato ocorre em mulheres em idade mais precoce, antes dos cinquenta anos (HELDER-WOOLDERINCK et al., 2016; RYAN et al., 2017; WOOLDERINCK et al., 2018). Além desta ser uma característica muito importante em se tratando de síndromes de predisposição hereditária ao câncer, a síndrome de Lynch no contexto das neoplasias ovarianas possui a marcante característica de idade ao diagnóstico de 15 a 20 anos antes do desenvolvimento de câncer de ovário esporádico ou relacionado à variantes patogênicas presentes nos genes *BRCA2* e de 5 a 10 anos antes do que nas mulheres portadoras de variantes patogênicas no gene *BRCA1* (GRINDEDAL et al., 2010; MAVADDAT et al., 2012). O estadiamento patológico inicial e a sobrevida livre de progressão também são características marcantes em pacientes portadoras de mutações em genes do sistema MMR. Diversos autores relatam mais de 80% dos casos estudados apresentando FIGO estágio I ou II e porcentagens semelhantes para sobrevida de cinco a dez anos livre de progressão (GRINDEDAL et al., 2010; NISKAKOSKI et al., 2013; HELDER-WOOLDERINCK et al., 2016; RYAN et al., 2017; WOOLDERINCK et al., 2018).

A representatividade de carcinomas ovarianos não serosos e não mucinosos, em especial aqueles de histologia de células claras e endometrióide relacionados à deficiência do *mismatch repair* são melhor descritos em estudos de grandes coortes de câncer de ovário cuja investigação é a associado à síndrome de Lynch (HELDER-WOOLDERINCK et al., 2016; RYAN et al., 2017). Essa é uma característica que difere o câncer de ovário em mulheres com síndrome de Lynch e casos esporádicos ou relacionados a *BRCA1/2*. Enquanto o câncer de ovário associado à síndrome de Lynch geralmente se apresenta como tumores epiteliais não serosos, os casos esporádicos e associados a mutações patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2* em sua maioria são cânceres de histologia serosa e de alto grau (KETABI et al., 2011, WOOLDERINCK et al., 2018). Esta estratificação ainda não é bem entendida.

Quanto aos genes relacionados, é sabido que a perda de expressão do gene *MSH2* oferece um risco de desenvolver câncer de ovário de 24% ao longo da vida. Este risco é maior em comparação com pacientes portadoras de mutações nos demais genes da via de reparo por pareamento incorreto de DNA (BONADONA et al., 2011). Alguns autores relatam que *MSH2* e *MLH1* seriam os genes que, quando a expressão é ausente, contribuem fortemente para o desenvolvimento de neoplasias epiteliais de ovário, devido a inativação total dos complexos MutS α e MutL α (ENGEL et al, 2012; HELDER-WOOLDERINCK et al., 2016). Outros autores associam um maior risco no desenvolvimento de tumores epiteliais de ovário em pacientes portadoras de variantes patogênicas em *MSH2* ou *MSH6* (BOILESEN; BISGAARD; BERNSTEIN, 2008), o que é verificado em uma porção maior de estudos; enquanto que não há evidências claras da contribuição *PMS2* para o aumento no risco de câncer de ovário (SANNE et al., 2018; DOMINGUEZ-VALENTIN et al., 2020).

É bem verdade que em razão destes estudos serem realizados com diferentes populações, seus resultados são sugestivos de diferenças interpopulacionais e por isso os resultados por trás de cada casuística podem ser dotados de uma biologia subjacente única. Assim considerando, observamos uma frequência de tumores ovarianos que possuem deficiência no sistema MMR em casuísticas não selecionadas muito relativa, variável de acordo com a população em estudo. Rambau et al. (2016) em estudo conduzido no Canadá, observou uma frequência de 13% de casos deficientes devido à ausência de expressão pela reação de imunohistoquímica de alguma das quatro principais proteínas envolvidas na via de reparo por pareamento incorreto de DNA. Destes montante, 2,4% correspondiam a carcinomas de células claras, onde 75% deles

apresentavam perda de expressão concomitante de MSH2/MSH6. Uma frequência global de tumores deficientes do *mismatch repair* mais baixa é observada por Jensen et al. (2008). Neste estudo conduzido na Califórnia, de 8% (4/52) dos tumores são *mismatch repair* deficientes de acordo com os resultados imunohistoquímicos. Dos quatro casos, dois eram carcinomas de células claras, com perda de expressão concomitante também de MSH2/MSH6.

No estudo mais recente semelhante a este trabalho de dissertação, Tajima et al. (2018), em Saitama, no Japão, obteve uma frequência de 0,98% (3/305) tumores deficientes do sistema *mismatch repair*. Um destes três casos corresponde a perda concomitante de MSH6/MSH2, também em um carcinoma ovariano do tipo não seroso. O que fica bem evidenciado por estes e outros estudos (MALANDER et al., 2006; DOMANSKA et al., 2007; LU et al., 2008) é que sejam casuísticas grandes ou pequenas, carcinomas ovarianos não serosos correspondem ao maior número de casos associados a deficiência desta via de reparo, onde a perda de expressão de *MSH2* é o mais observado. Tanto em termos de frequência observada quanto da histologia do tumor dMMR, os resultados do nosso estudo estão em concordância com os diversos autores citados.

Neoplasias ovarianas dMMR também possuem mecanismos patológicos distintos que influem diretamente no prognóstico. Ser capaz de reconhecer esses tumores proporciona aos pacientes uma perspectiva de prognóstico distinta da habitual. Um destes mecanismos é a expressão de PD-L1, observada por diversos autores (SEPESI et al., 2017; DRAKES et al., 2018; OJALVO et al., 2018; XIAO et al., 2018). A proteína PD-1 atua em um determinado ponto de verificação de células T do sistema imunológico. Ao estabelecer a ligação com seu respectivo ligante, PD-L1, impede o organismo de montar uma resposta imune contra células normais. Esta interação também é denominada de *checkpoint* imunológico. Alguns tipos neoplásicos podem adquirir esses *checkpoints*, burlando assim o sistema imunológico do paciente de atacá-los (REIS, MACHADO, 2020).

De fato, para carcinomas ovarianos é observada uma correlação entre a expressão de PD-1 e PD-L1 com tumores de alto grau e doença em estágio IV, pois há um bloqueio do sistema imunológico em atacá-los (WANG et al., 2017; WIESER et al., 2018). É observado que PD-Ls são expressos diversos outros tumores sólidos, como carcinomas renais, melanoma, pulmonar, ovariano e de endométrio (CHEN et al., 2016; ZHU et al., 2017, SEPESI et al., 2017; SLOAN et al., 2017), e que inibidores de checkpoint imunológico, como os anticorpos anti-PD-1 e anti-PD-L1, mostraram eficácia em

cânceres com alta carga mutacional, incluindo tumores com instabilidade de microssatélites (MSI) (VENTRIGLIA et al., 2017).

Nesse sentido, em 2020 o FDA (do inglês: *Food and Drug Administration*) aprovou para o primeiro tratamento de câncer para qualquer tumor sólido desde que apresente alta instabilidade de microssatélites (MSI-H) ou deficiência de reparo de incompatibilidade (dMMR), o Pembrolizumabe; um marco no tratamento ao câncer, que até então ao aprovar uma droga anticâncer levava em consideração a localização tumoral, e não uma característica em comum.

A maioria das reações de imunohistoquímicas apresentaram marcação dos núcleos tumorais de modo forte, difuso. Para nove casos a positividade foi dita como fraca e apresentou-se de modo focal, em especial para as proteínas MLH1 e PMS2. A reação de IHQ foi repetida em secções do bloco inteiro, analisadas em duplo cego por dois médicos patologistas, confirmando a positividade do tumor para a proteína questionável até então com o devido controle interno positivo, embora ainda apresentasse padrão de imunocoloração fraco e focal. Variáveis pré-analíticas, analíticas e pós-analíticas ligadas a metodologia da imunohistoquímica podem estar relacionadas com este resultado. É possível que o agente fixador destas amostras e tempo que os tecidos permaneceram embebidos em formalina antes da inclusão na parafina; bem como o quão uniforme foi a fixação destes tecidos e a própria qualidade e especificidade de marcação do anticorpo utilizado possam ter influenciado na marcação antígeno-anticorpo (RICHMAN 2015).

Para definir o *status* da instabilidade de microssatélite as diretrizes de Bethesda propõem o uso de um painel pentaplex constituído por três marcadores de repetição de dinucleotídeos e dois marcadores de repetição mononucleotídica (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 e D17S250). No entanto, marcadores de repetição dinucleotídicas possuem baixa sensibilidade e especificidade diagnóstica em comparação com marcadores mononucleotídicas. Em substituição aos marcadores de repetição de dinucleotídeos é recomendado o uso de marcadores de repetição mononucleotídicas e um painel pentaplex de repetições quase monomórficas composto pelos marcadores BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 e NR-27 tem sido difundido para a determinação do status de instabilidade de microssatélites (SURAWEEERA et al., 2002; BUHARD et al, 2004; UMAR et al, 2004; WONG et al, 2006; XICOLA et al, 2007; GOEL et al, 2010; YOU et al, 2010), sendo este o painel utilizado neste estudo.

No contexto dos carcinomas ovarianos, vários marcadores para identificar MSI em EOC já foram descritos na literatura, mas quais seriam os marcadores ideais não é

vem definido e a padronização de um painel é crítica. O uso de *loci* de microssatélite de repetição de mononucleotídeos tem sido mais amplamente utilizado no contexto de carcinomas colorretais, com alguns poucos estudos fazendo uso do mesmo para a definição do *status* MSI em tumores ginecológicos (WONG et al., 2006; PAGIN et al., 2013). Em contrapartida, se o painel de Bethesda é sensível o suficiente para detectar instabilidade de microssatélites em tumores ovarianos ainda é inconclusivo (DESHPANDE et al., 2020). A frequência de MSI em tumores ovarianos variável entre 6-37% levanta questionamentos sobre os marcadores de microssatélite utilizados, a qualidade do tecido preservado, a histologia tumoral e o N amostral, não sendo totalmente claro se os resultados são tendenciados quanto a cada uma destas variáveis. (ORTH et al., 1994; SHELSON et al., 1995; PARK, FELIZ, WRIGHT, 1995; IWABUCHI et al., 1995; KING et al., 1995; FUGITA et al., 1995; TANGIR et al., 1996; SOOD, BULLER, 1996; ARZIMANOGLU et al., 1996; SHIH et al., 1998; WONG et al., 2006; PAGIN et al., 2013; DESHPANDE et al., 2020).

O padrão ouro na análise de instabilidade de microssatélites consiste em parear a análise da amostra de DNA tumoral com uma amostra de DNA normal para cada paciente, uma vez que MSI é identificada quando são observados alelos em amostra de tecido tumoral que não estão presentes em amostras de tecido normal do mesmo indivíduo (SINGER et al., 2004). Atendendo à essas prerrogativas foi possível classificar com precisão 40% da nossa casuística. Destes, 35 foram considerados como MSI estáveis, sendo destes 5 achados polimórficos e 5 como MSI-L. Não foi possível parear as reações de tecido tumoral e tecido não tumoral para os demais 60%. Para estes, uma diferente estratégia de determinação do status da instabilidade de microssatélite foi adotada.

Alguns estudos têm apontado para a possibilidade de uso do painel quase monomórficos utilizado para determinação do status da instabilidade de microssatélite na presente casuística mesmo diante da ausência de DNA normal correspondente ao caso, por meio da definição prévia de um faixa de variação quase monomórfica para cada um dos alelos utilizados (SURAWEERA et al. 2002; BUHARD et al., 2006; GOEL et al. 2010; PATIL et al. 2012; CAMPANELLA et al., 2014). Esta é uma abordagem padronizada para carcinomas colorretais e carcinomas endometriais em diferentes populações (WONG, 2006). No Brasil, Campanella et al. (2014) otimizaram o mesmo painel pentaplex composto pelos marcadores mononucleotídicos NR-27, NR-21, NR-24, BAT-25 e BAT-26 para análise de instabilidade de microssatélite sem a necessidade da reação de DNA não tumoral como referência, independentemente do tumor analisado. A

estratégia baseia-se em uma faixa de variação quase monomórfica para cada marcador, estabelecida a partir da média do tamanho dos alelos analisados na população de estudo. Os autores concluem que a metodologia é confiável para a análise da instabilidade de microssatélites, uma vez que nenhum dos controles celulares sabidamente conhecidos como MSS e MSI-H foram erroneamente classificados.

Tomando como base esta metodologia de análise de instabilidade de microssatélite estabelecida para a população brasileira, dos casos da presente casuística onde não foi possível parear as reações, havendo disponível apenas os dados da PCR multiplex para o DNA tumoral, 17,7% destes (8/45) são MSI-L, sendo mais comum a observação de dois alelos no mesmo *loci* alélico do que um alelo sendo este fora do QMRV. Os demais 37 tumores possuem todos os *loci* de microssatélites dentro da faixa de variação utilizada e são classificados como MSS. Em virtude desta metodologia não constituir o padrão ouro de análise, é sugerido que os resultados da IHQ possam auxiliar na classificação (PATIL et al. 2012; CAMPANELLA et al., 2014). Na presente casuística, todos estes casos tratam-se de reações de imunohistoquímica que demonstram imunopositividade das quatro proteínas da via *mismatch repair*, endossando tratarem-se de tumores estáveis.

Quanto aos casos de MSI-L determinados pelo QMRV, é possível que tratem-se de polimorfismos. É dito como polimorfismo a existência de dois ou mais fenótipos alternativos em termos populacionais e, apesar da baixa frequência de ocorrência nos loci de microssatélites analisados neste estudo, não constitui uma instabilidade de microssatélite, sendo um evento biologicamente normal. A identificação de um polimorfismo é importante pois evita que o marcador polimórfico seja caracterizado como instável, em especial quando associado a um outro, tornando a classificação como MSI-H e conseqüentemente prejudicando os resultados (SOOD et al., 2001). No entanto, nenhum dos tumores nestas condições na presente casuística foram classificados como MSI-H, não havendo um viés nesse sentido. Nesta casuística as regiões de polimorfismos são notadas especialmente em BAT-25 e BAT-26, em concordância com a literatura quanto aos alelos mais polimórficos desse painel na população brasileira (CAMPANELLA et al., 2014).

A impossibilidade de pareamento das reações entre DNA tumoral e DNA normal para comparação entre o perfil de expressão alélico, sendo assim possível determinar o status da instabilidade de microssatélites é uma limitação metodológica observada por outros autores, seja devido a DNA normal inexistente, insuficiente ou inviável

(BUHARD et al., 2006; CAMPANELLA et al., 2014; KIM et al., 2020). Uma série de variáveis podem estar envolvidas. Em especial, quando se trata de pesquisa, a característica epidemiológica de alto índice de mortalidade em decorrência das complicações tumorais influencia na possibilidade de se obter DNA normal proveniente de amostra de sangue. Isso é bem verdade quando defronte as características epidemiológicas dos tumores epiteliais de ovário.

Além disso, fatores como: a existência e disponibilidade de outros blocos de parafina contendo cortes livres de neoplasia, a presença de margens cirúrgicas livres de neoplasia suficiente para extração de DNA viável, o tempo e o protocolo de fixação das amostras, além da própria baixa celularidade e baixa atividade celular do tecido normal parecem ser fatores limitantes na obtenção de DNA não tumoral para parear as reações. Ao consultar o Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (SERPAT-HCRP-USP), responsáveis pelo processamento e armazenamento das amostras da presente casuística, não foi identificada nenhuma modificação em protocolos operacionais padrão desde a retirada da peça cirúrgica das pacientes até o armazenamento, passando pelos processos de fixação e parafinização das amostras que pudessem justificar a baixa qualidade de parte delas. Também, ao comparar os grupos das amostras onde foi possível se obter DNA não tumoral viável com o grupo de amostras onde isso não foi possível, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre amostras mais recentes ou mais antigas, sendo aleatório obter-se amostras de boa qualidade ou não proveniente de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina.

Quanto a instabilidade de microssatélites, em termos biológicos é possível que os tumores que possuem alta instabilidade de microssatélites apresentem comportamento distinto daqueles tumores que são estáveis. No entanto, não é claro se os tumores MSI-L e MSS devem ser tratados como uma única categoria ou como categorias distintas (BOLAND et al., 2008; LAGHI; BIANCHI; MALESCI, 2008). Em se tratando particularmente das neoplasias epiteliais até mesmo diante de casos MSI-H é necessário cautela, uma vez que a instabilidade de microssatélites em tumores ovarianos é um evento que pode estar associado para além da deficiência do MMR.

De acordo com Pal et al., (2008) a instabilidade de microssatélites pode ocorrer em 7-22% dos carcinomas ovarianos esporádicos. Caliman et al. (2012), fazendo uso do painel de Bethesda para avaliar a instabilidade de microssatélites em pacientes com cistadenocarcinoma seroso ovariano em comparação com cistadenoma seroso ovariano e

ovários normais constataram a ocorrência de MSI-L em 7,1% e MSS em 14% de ovários normais. Uma porção de 30% de MSI-L e 10% de MSS também foi verificada em tumores epiteliais de ovário benignos, sugerindo que a instabilidade de microssatélites pode surgir como consequência da exposição constante do epitélio ovariano ao processo ovulatório, não sendo essa uma característica apenas de tumores ovarianos malignos ou como indicativo de um background genético hereditário para a síndrome de Lynch.

Akbari et al. (2016) realizaram a análise de instabilidade de microssatélite e investigaram mutações germinativas para 656 mulheres com tumores ovarianos malignos. Destas, apenas quatro possuíam uma mutação MMR claramente patogênica e todas elas possuíam MSI-H. No entanto 84 mulheres que possuíam MSI-H não possuíam variante patogênica germinativa alguma para os genes MMR. Usando MSI-H como critério de pré-triagem, os autores constataram 100% de sensibilidade, mas com apenas 4,5% de valor preditivo positivo. Logo, nem todo tumor epitelial de ovário MSI-H é forte candidato para a síndrome de Lynch. Latham et al., (2019) por exemplo realizaram o sequenciamento para linhagem germinativa de 46 pacientes com câncer de ovário MSI-H e não identificaram nenhuma paciente com síndrome de Lynch.

Nesse sentido, Hodan et al. (2020) cujo trabalho constitui o mais recente em termos de estimativa na prevalência de síndrome de Lynch em mulheres com câncer de ovário deficientes do MMR, propõem o uso da imunohistoquímica como método de triagem para posterior análise de mutação germinativa, sem realização da etapa de instabilidade de microssatélite. Mais de 65% das pacientes com câncer de ovário dMMR por IHQ nesta coorte tinham uma variante patogênica de linhagem germinativa que confirmava LS.

No estudo de Kim et al., (2020) é abordado as características de desempenho das estratégias de rastreamento para identificar síndrome de Lynch em mulheres com câncer de ovário a partir de IHQ, MSI, análise de metilação da região promotora de *MLH1*, e sequenciamento de linhagem germinativa. Os autores definiram as respectivas sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos das estratégias de rastreamento em comparação com o padrão ouro que seria nesse contexto o resultado do sequenciamento de linhagem germinativa e verificaram que a IHC conjunta com análise de metilação do promotor *MLH1* teve o melhor desempenho, sendo provavelmente a abordagem mais econômica e eficiente no ambiente clínico. O emprego da instabilidade de microssatélites foi a segunda abordagem de melhor desempenho. No entanto, embora a abordagem de IHC com análise de metilação do promotor de *MLH1* mais MSI tenha

sido considerado como tendo a melhor sensibilidade, esta detectou apenas um caso adicional de LS quando comparado com IHC com análise de metilação do promotor de *MLH1*, sugerindo que para neoplasias ovarianas, a instabilidade de microssatélites possa não significar em grandes contribuições diagnósticas.

Em nossa casuística, o único caso dMMR evidenciado pela perda concomitante de MSH2/MSH6 na IHQ e é classificado com estável de acordo com a análise MSI. Lee et al. (2014) comparou a concordância entre a imunohistoquímica e o teste de MSI (considerando o painel de Bethesda) para identificar a deficiência de MMR em tumores epiteliais de ovário. De acordo com nossa revisão, este é até então o único estudo a avaliar a concordância entre os testes de IHC e MSI para identificar a deficiência de MMR em tumores ovarianos epiteliais. Os autores relataram taxas de concordância pobres no câncer de ovário - cerca de 68% - em comparação com as taxas de concordância mais altas - maior que 95% - no câncer colorretal. É cogitado que as altas taxas de heterogeneidade genética presente em tumores ovarianos explique essa elevada discordância e levantamos esta como possível causa para a discordância IHQ/MSI observada em nosso caso (KHALIQUE et al., 2007), descartando ainda a possibilidade de que a IHQ para este caso trata-se de um falso-negativo, uma vez que há inequívoca reação estromal como controle positivo. A análise de cada reação foi realizada por ao menos dois médicos patologistas experientes e de modo independente. Logo, a qualidade da reação e influência da análise não seria o cerne da questão como possíveis causas propostas para esta discordância por Lee et al. (2014).

Diante das estratégias de abordagem para a triagem de tumores possivelmente associados a síndrome de Lynch, no contraponto das estratégias de triagem moleculares, as principais condutas para investigação clínica da síndrome de Lynch são os critérios de Amsterdam II e as diretrizes revisadas de Bethesda. Estes critérios clínicos fornecem o indicativo para a realização de teste de imuno-histoquímica e testes moleculares em busca de mutações nos genes MMR. No entanto, Hampel et al., (2008) em estudo conduzido com 500 pacientes com câncer colorretal, observaram que aproximadamente 62% dos pacientes portadores alguma variante patogênica nos genes MMR não preencheram aos critérios de Amsterdam e em 25% dos casos também não preenchiam as diretrizes revisadas de Bethesda. Por sua vez, em estudo semelhante conduzido com 870 pacientes também com câncer colorretal, não selecionados com outro critério que não fosse esse e independentemente do histórico familiar. Barnetson et al., (2006) verificaram que apenas 42% dos pacientes que possuíam alguma variante patogênica em genes relacionados a

síndrome de Lynch cumpriram os critérios de Amsterdam, interrogando a possibilidade de que os critérios de Amsterdam talvez não sejam sensíveis o suficiente na identificação de pacientes portadores Síndrome de Lynch.

Logo, embora os critérios de Amsterdam II e as diretrizes revisadas de Bethesda sejam importantes diretivas diagnósticas, devemos considerar as limitações existentes em detectar muitos pacientes com deficiência do sistema MMR, em especial pacientes com câncer de ovário, uma vez os critérios de Amsterdam II não incluem o câncer de ovário como um câncer associado a síndrome de Lynch e as diretrizes revisadas da Bethesda estão focadas no câncer colorretal (NAKAMURA et al., 2014; TAKEDA et al., 2018), Também é discutido e por hora inconclusivo se os marcadores do painel de Bethesda são sensíveis o suficiente para detectar MSI em câncer ginecológico, sendo concebível que *loci* de microssatélites específicos possam ser afetados de maneira particular de acordo com o tipo tumoral (LEE et al., 2014; SUPEK, LEHNER, 2015; FRAUNE et al., 2020).

5 CONCLUSÃO

A presente casuística é caracterizada por tumores epiteliais de ovário com média de idade ao diagnóstico precoce, cujo estadiamento tumoral em mais de 2/3 dos casos encontra-se entre grau FIGO I e II e cujos tumores mais representativos são do subtipo seroso e do Borderline. Quanto ao conjunto de tumores, a frequência de dMMR observada é de 1,33% (1/75), o que é baixo quando comparado com carcinomas colorretais e de endométrio, por exemplo, onde a frequência média de tumores dMMR é maior (FERGUSON et al., 2014; YURGELUN et al., 2017). No entanto, a frequência observada de tumores epiteliais de ovário dMMR no presente estudo está entre o anteriormente relatado pela literatura (MALANDER et al., 2006; TAJIMA et al., 2018). Excetuando-se este caso, todos os demais tumores desta casuística caracteriza-se como tumores pMMR, uma vez que houve imunorreatividade positiva para as quatro proteínas da via MMR, associado com o status estável de microssatélite, não havendo nenhum caso indicativo para proceder com a análise de metilação da região promotora do gene *MLH1*.

Estes resultados deste estudo não suportam o rastreio universal para todos os tumores epiteliais de ovário quanto às proteínas MMR, uma vez que a frequência observada é baixa. É sugestivo que o rastreio seja mais efetivo quando a investigação está voltada para o contexto de carcinomas ovarianos de histologia endometrióide e de células claras, uma vez que o nosso dMMR achado faz parte de pequeno grupo de tumores desta natureza (1/5), sendo esta abordagem também recomendada por outros autores (FRAUNE et al., 2020).

Amostras de sangue como fonte do tecido não tumoral também é sugestivo, uma vez que diversas variáveis pré-analíticas podem influenciar na obtenção de DNA não tumoral e, como método de rastreio de rotina esta é uma estratégia viável. Diante das limitações metodológicas encontradas em parear as reações de tecido tumoral e tecido não tumoral para definição de tumores dMMR fazendo uso da MSI, propomos que a IHQ com devida análise da metilação da região promotora de *MLH1* em casos de ausência de imunocoloração para *MLH1* seja a conduta mais interessante na abordagem de carcinomas ovarianos, sendo também previamente já evidenciada na literatura (KIM et al., 2020). A definição de uma faixa de variação quase monomórfica para os marcadores de instabilidade de microssatélite aqui utilizados para cada população de interesse é uma útil ferramenta, principalmente com uso combinado à IHQ para estabelecer o status de proficiência ou deficiência do sistema de reparo por mal pareamento de DNA. Isso

otimizaria a realização de mais estudos, por se tratar de uma ferramenta de fácil aplicabilidade e custo reduzido, além de excluir a necessidade de uso de DNA normal.

Por fim, estes são os resultados da primeira investigação para câncer de ovário associado a síndrome de Lynch utilizando uma casuística não selecionada da população brasileira. Estudos adicionais, com casuísticas melhor representadas por carcinomas não serosos e não mucinosos fazem-se necessárias para que melhor se entenda quanto a problemática de neoplasias ovarianas associadas à síndrome de Lynch, em especial para esta população de estudo, projetando possíveis intervenções em políticas públicas de saúde da mulher.

REFERÊNCIAS

- AALTONEN, L. A. et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. **Science**, v. 260, n. 5109, p. 812-816, 1993.
- ABBOTT, S. E. et al. Recreational physical activity and survival in African-American women with ovarian cancer. **Cancer Causes & Control**, v. 29, n. 1, p. 77-86, 2018.
- ABRHA, A. et al. Triagem universal de malignidades gastrointestinais para deficiência de reparo de incompatibilidade em Stanford. **JNCI Cancer Spectrum**, 2020.
- ACS, G. Serous and mucinous borderline (low malignant potential) tumors of the ovary. **Pathology Patterns Reviews**, v. 123, n. suppl_1, p. S13-S57, 2005.
- ADAR, T. et al. Universal screening of both endometrial and colon cancers increases the detection of Lynch syndrome. **Cancer**, v. 124, n. 15, p. 3145-3153, 2018.
- AKBARI, M. R. et al. Correlation between germline mutations in MMR genes and microsatellite instability in ovarian cancer specimens. **Familial Cancer**, v. 16, n. 3, p. 351-355, 2017.
- American Cancer Society (ACS). 2019. Ovarian cancer. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/about/what-is-ovarian-cancer.html>> Acesso em: 02 nov. 2021.talco
- ANGLESIO, M. S. et al. Cancer-associated mutations in endometriosis without cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 19, p. 1835-1848, 2017.
- ANGLESIO, M. S. et al. Multifocal endometriotic lesions associated with cancer are clonal and carry a high mutation burden. **The Journal of pathology**, v. 236, n. 2, p. 201-209, 2015.
- ANGLESIO, M. S.; YONG, P. J. Endometriosis-associated ovarian cancers. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 60, n. 4, p. 711-727, 2017.
- ARZIMANOGLU, I. I.; GILBERT, F.; BARBER, H. RK. Microsatellite instability in human solid tumors. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 82, n. 10, p. 1808-1820, 1998.
- BARNETSON, R. A. et al. Identification and survival of carriers of mutations in DNA mismatch-repair genes in colon cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 26, p. 2751-2763, 2006.
- BARNES, Bethany M. et al. Distinct transcriptional programs stratify ovarian cancer cell lines into the five major histological subtypes. **Genome medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-19, 2021.
- BARROW, E. et al. Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: a report of 121 families with proven mutations. **Clinical genetics**, v. 75, n. 2, p. 141-149, 2009.

BASSIOUNY, D. et al. Endometriosis-associated ovarian cancer is a subset with a more favorable outcome and distinct clinical-pathologic characteristics. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 38, n. 5, p. 435-442, 2019.

BELLIZZI, A. M.; FRANKEL, W. L. Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. **Advances in anatomic pathology**, v. 16, n. 6, p. 405-417, 2009.

BENNETT, J. A. et al. Mismatch Repair Protein Expression in Clear Cell Carcinoma of the Ovary. **The American journal of surgical pathology**, v. 40, n. 5, p. 656-663, 2016.

BERAL, V. et al. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian C. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. **Lancet**, v. 371, p. 303-314, 2008.

BEREK, J. S. et al. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. **International journal of gynecology & obstetrics**, v. 143, p. 59-78, 2018.

BJORNSON, K. P. et al. Assembly and molecular activities of the MutS tetramer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 36, p. 34667-34673, 2003.

BOILESEN, A. E. B.; BISGAARD, M. L.; BERNSTEIN, I. Risk of gynecologic cancers in Danish hereditary non-polyposis colorectal cancer families. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 87, n. 11, p. 1129-1135, 2008.

BOLAND, C. R. Evolution of the nomenclature for the hereditary colorectal cancer syndromes. **Familial cancer**, v. 4, n. 3, p. 211-218, 2005.

BOLAND, C. R.; TRONCALE, F. J. Familial colonic cancer without antecedent polyposis. **Annals of internal medicine**, v. 100, n. 5, p. 700-701, 1984.

BOLAND, C. R. et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. **Cancer research**, v. 58, n. 22, 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. **Familial cancer**, v. 7, n. 1, p. 41-52, 2008.

BONADONA, V. et al. Cancer risks associated with germline mutations in *MLH1*, *MSH2*, and *MSH6* genes in Lynch syndrome. **Jama**, v. 305, n. 22, p. 2304-2310, 2011.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BRILHANTE, A. V. M. et al. Endometriosis and ovarian cancer: an integrative review (endometriosis and ovarian cancer). **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 18, n. 1, p. 11, 2017.

BRONNER, C. E. et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue *hMLH1* is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. **Nature**, v. 368, n. 6468, p. 258-261, 1994.

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 Prevention Research**, v. 10, n. 2, p. 108-115, 2017.

BUHARD, O. et al. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. **Journal of clinical oncology**, v. 24, n. 2, p. 241-251, 2006.

BUHARD, O. et al. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. **Disease markers**, v. 20, n. 4, 5, p. 251-257, 2004.

BURDETT, V. et al. In vivo requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 12, p. 6765-6770, 2001.

BURGESS, Brian T.; KOLESAR, Jill M. Defective DNA repair in hereditary ovarian cancers: Implications for therapy. *American Journal of Health-System Pharmacy*, v. 75, n. 21, p. 1697-1707, 2018.

BUZA, N.; ZIAI, J.; HUI, P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 16, n. 5, p. 591-604, 2016.

CALIMAN, L. P. et al. Evaluation of microsatellite instability in women with epithelial ovarian cancer. **Oncology letters**, v. 4, n. 3, p. 556-560, 2012.

CAMPANELLA, N. C. et al. Optimization of a pentaplex panel for MSI analysis without control DNA in a Brazilian population: correlation with ancestry markers. **European Journal of Human Genetics**, v. 22, n. seven, p. 875-880, 2014.

CANNIOTO, R. A. et al. Recreational physical inactivity and mortality in women with invasive epithelial ovarian cancer: evidence from the Ovarian Cancer Association Consortium. **British journal of cancer**, v. 115, n. 1, p. 95-101, 2016.

CASADEI, S. et al. Contribution of inherited mutations in the BRCA2-interacting protein PALB2 to familial breast cancer. **Cancer research**, v. 71, n. 6, p. 2222-2229, 2011.

CHAKRABORTY, U.; ALANI, E. Understanding how mismatch repair proteins participate in the repair/anti-recombination decision. **FEMS yeast research**, v. 16, n. 6, p. fow071, 2016.

CHEN, J. et al. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. **Annals of oncology**, v. 27, n. 3, p. 409-416, 2016.

CHENE, G. et al. DNA damage signaling and apoptosis in pre-invasive tubal lesions of ovarian carcinoma. **International Journal of Gynecologic Cancer**, v. 25, n. 5, 2015.

CHIEN, J.; POOLE, E. M. Ovarian cancer prevention, screening, and early detection: report from the 11th biennial ovarian cancer research symposium. **International Journal of Gynecologic Cancer**, v. 27, n. S5, 2017.

CLAYTON, P. E. et al. Growth hormone, the insulin-like growth factor axis, insulin and cancer risk. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 1, p. 11-24, 2011.

COLLE, R. et al. Immunotherapy and patients treated for cancer with microsatellite instability. **Bulletin du cancer**, v. 104, n. 1, p. 42-51, 2017.

CRAMER, D. W. et al. Genital talc exposure and risk of ovarian cancer. **International journal of cancer**, v. 81, n. 3, p. 351-356, 1999.

CRESS, R. D. et al. Characteristics of long-term survivors of epithelial ovarian cancer. **Obstetrics and gynecology**, v. 126, n. 3, p. 491, 2015.

DE LA CHAPELLE, Albert. The incidence of Lynch syndrome. **Familial cancer**, v. 4, n. 3, p. 233-237, 2005.

DESHPANDE, M. et al. Gynecological Cancers Caused by Deficient Mismatch Repair and Microsatellite Instability. **Cancers**, v. 12, n. 11, p. 3319, 2020.

DIXON-SUEN, S. C. et al. The Association between hysterectomy and ovarian cancer risk: a population-based record-linkage study. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 111, n. 10, p. 1097-1103, 2019.

DOMANSKA, K. et al. Ovarian cancer at young age: the contribution of mismatch-repair defects in a population-based series of epithelial ovarian cancer before age 40. **International Journal of Gynecologic Cancer**, v. 17, n. 4, 2007.

DOMINGUEZ-VALENTIN, M. et al. Cancer risks by gene, age, and gender in 6350 carriers of pathogenic mismatch repair variants: findings from the Prospective Lynch Syndrome Database. **Genetics in Medicine**, v. 22, n. 1, p. 15-25, 2020.

DRAKES, M. L. et al. Stratification of ovarian tumor pathology by expression of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand-1 (PD-L1) in ovarian cancer. **Journal of ovarian research**, v. 11, n. 1, p. 43, 2018.

EARP, M. A. et al. Genome-wide association study of subtype-specific epithelial ovarian cancer risk alleles using pooled DNA. **Human genetics**, v. 133, n. 5, p. 481-497, 2014.

EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 457-463, 2004.

EISEN, J.A. Mechanistic basis for microsatellite instability. In *Microsatellites: evolution and applications* (ed. Goldstein, D.B & Schlotterer, C.), pp. 34-88. **Oxford University Press**, Oxford. 1999.

ELIAS, K. M. et al. Primordial germ cells as a potential shared cell of origin for mucinous cystic neoplasms of the pancreas and mucinous ovarian tumors. **The Journal of pathology**, v. 246, n. 4, p. 459-469, 2018.

ENGEL, C. et al. Risks of less common cancers in proven mutation carriers with lynch syndrome. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 35, p. 4409-4415, 2012.

ENGELAND, A.; TRETTLI, S.; BJØRGE, T. Height, body mass index, and ovarian cancer: a follow-up of 1.1 million Norwegian women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 16, p. 1244-1248, 2003.

EREKSON, E. A. et al. Socioeconomic indicators and hysterectomy status in the United States, 2004. **The Journal of reproductive medicine**, v. 54, n. 9, p. 553, 2009.

ERRICHIELLO, E. et al. SMARCA4 inactivating mutations cause concomitant Coffin–Siris syndrome, microphthalmia and small-cell carcinoma of the ovary hypercalcaemic type. **The Journal of pathology**, v. 243, n. 1, p. 9-15, 2017.

FARABAUGH, P. J. et al. Genetic studies of the lac repressor: VII. On the molecular nature of spontaneous hotspots in the lacI gene of Escherichia coli. **Journal of molecular biology**, v. 126, n. 4, p. 847-863, 1978.

FATHALLA, M. F. et al. Incessant ovulation—a factor in ovarian neoplasia. **Lancet**, v. 2, n. 7716, p. 163, 1971.

FDA. Food and Drug Administration. FDA approves pembrolizumab for adults and children with TMB-H solid tumors. Disponível em: <[https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-pembrolizumab-first-line-treatment-msi-hdmmr-colorectal-cancer#:~:text=On%20June%2029%2C%202020%2C%20the,deficient%20\(dMMR\)%20colorectal%20cancer.](https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-pembrolizumab-first-line-treatment-msi-hdmmr-colorectal-cancer#:~:text=On%20June%2029%2C%202020%2C%20the,deficient%20(dMMR)%20colorectal%20cancer.)> Acesso em: 12 jan. 2020.

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. 120, n. 24, p. 3932-3939, 2014.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International journal of cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941-1953, 2019.

FISCHEROVA, D. et al. Diagnosis, treatment, and follow-up of borderline ovarian tumors. **The oncologist**, v. 17, n. 12, p. 1515, 2012.

FISHEL, R. et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 1027-1038, 1993.

FORTNER, R. T. et al. Reproductive and hormone-related risk factors for epithelial ovarian cancer by histologic pathways, invasiveness and histologic subtypes: results from the EPIC cohort. **International journal of cancer**, v. 137, n. 5, p. 1196-1208, 2015.

FRAUNE, C. et al. High homogeneity of MMR deficiency in ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 156, n. 3, p. 669-675, 2020.

FUJITA, M. et al. Microsatellite instability and alterations in the hMSH2 gene in human ovarian cancer. **International journal of cancer**, v. 64, n. 6, p. 361-366, 1995.

GAITSKELL, K. et al. Ovarian cancer and smoking: individual participant meta-analysis including 28 114 women with ovarian cancer from 51 epidemiological studies. 2012.

GAITSKELL, K. et al. Tubal ligation and ovarian cancer risk in a large cohort: Substantial variation by histological type. **International journal of cancer**, v. 138, n. 5, p. 1076-1084, 2016.

GARAVAGLIA, E. et al. The origin of endometriosis-associated ovarian cancer from uterine neoplastic lesions. **Medical Hypotheses**, v. 110, p. 80-82, 2018.

GATES, M. A. et al. Risk factors for epithelial ovarian cancer by histologic subtype. **American journal of epidemiology**, v. 171, n. 1, p. 45-53, 2010.

GEISLER, J. P. et al. Mismatch repair gene expression defects contribute to microsatellite instability in ovarian carcinoma. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 98, n. 10, p. 2199-2206, 2003.

GERSHENSON, D. M. Management of borderline ovarian tumours. **Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 41, p. 49-59, 2017.

GIMBEL, H.; SETTNES, A.; TABOR, A. Hysterectomy on benign indication in Denmark 1988–1998: a register based trend analysis. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 80, n. 3, p. 267-267, 2001.

GOEL, A. et al. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. **PloS one**, v. 5, n. 2, p. e9393, 2010.

GOLOGAN, A. et al. Performance of the revised Bethesda guidelines for identification of colorectal carcinomas with a high level of microsatellite instability. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 129, n. 11, p. 1390-1397, 2005.

GOODE, E. L. et al. A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ovarian cancer at 2q31 and 8q24. **Nature genetics**, v. 42, n. 10, p. 874-879, 2010.

GOODMAN, Julie E. et al. A critical review of talc and ovarian cancer. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 23, n. 5, p. 183-213, 2020.

GORMAN, J. et al. Dynamic basis for one-dimensional DNA scanning by the mismatch repair complex Msh2-Msh6. **Molecular cell**, v. 28, n. 3, p. 359-370, 2007.

GRADIA, S. et al. hMSH2–hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA. **Molecular cell**, v. 3, n. 2, p. 255-261, 1999.

GREEN, J. et al. Height and cancer incidence in the Million Women Study: prospective cohort, and meta-analysis of prospective studies of height and total cancer risk. **The lancet oncology**, v. 12, n. 8, p. 785-794, 2011.

GRINDEDAL, E. M. et al. Survival in women with MMR mutations and ovarian cancer: a multicentre study in Lynch syndrome kindreds. **Journal of medical genetics**, v. 47, n. 2, p. 99-102, 2010.

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. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 12, n. 6, p. 765-770, 2010.

HALFORD, S. ER et al. MSI-low, a real phenomenon which varies in frequency among cancer types. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 201, n. 3, p. 389-394, 2003.

HAMPEL, H. et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 35, p. 5783, 2008.

HARFE, B. D.; JINKS-ROBERTSON, S. DNA mismatch repair and genetic instability. **Annual review of genetics**, v. 34, n. 1, p. 359-399, 2000.

HARKNESS, E. F. et al. Lynch syndrome caused by *MLH1* mutations is associated with an increased risk of breast cancer: a cohort study. **Journal of medical genetics**, v. 52, n. 8, p. 553-556, 2015.

HARTER, P. et al. Gynecologic Cancer InterGroup (GCIG) consensus review for ovarian tumors of low malignant potential (borderline ovarian tumors). **International Journal of Gynecologic Cancer**, v. 24, n. Supp 3, 2014.

HAUSER, I. J.; WELLER, C. V. A further report on the cancer family of Warthin. **The American Journal of Cancer**, v. 27, n. 3, p. 434-449, 1936.

HAUSE, R. J. et al. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. **Nature medicine**, v. 22, n. 11, p. 1342-1350, 2016.

HEINEN, C. D. et al. Human *MSH2* (hMSH2) protein controls ATP processing by hMSH2-hMSH6. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 46, p. 40287-40295, 2011.

HEINEN, C. D. Genotype to phenotype: analyzing the effects of inherited mutations in colorectal cancer families. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 693, n. 1-2, p. 32-45, 2010.

HELDER-WOOLDERINK, J. M. et al. Ovarian cancer in Lynch syndrome; a systematic review. **European Journal of Cancer**, v. 55, p. 65-73, 2016.

HENNESSY, B. T.; COLEMAN, R. L.; MARKMAN, M. Ovarian cancer. **The lancet**, v. 374, n. 9698, p. 1371-1382, 2009.

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

HODAN, R. et al. Prevalence of Lynch syndrome in women with mismatch repair-deficient ovarian cancer. **Cancer Medicine**, v. 10, n. 3, p. 1012-1017, 2021.

IARC. Research. Cancer Statistics Resources. CANCER TODAY. Globocan. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/25-Ovary-fact-sheet.pdf>> Acesso em: 20 dez. 2020.

INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016/2017. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>> Acesso em: 17 ago. 2020.

IONOV, Y. et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. **Nature**, v. 363, n. 6429, p. 558-561, 1993.

IWIWABUCHI, H. et al. Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors. **Cancer research**, v. 55, n. 24, p. 6172-6180, 1995.

JENSEN, K. C. et al. Microsatellite instability and mismatch repair protein defects in ovarian epithelial neoplasms in patients 50 years of age and younger. **The American journal of surgical pathology**, v. 32, n. 7, p. 1029-1037, 2008.

JEON, Y. et al. Dynamic control of strand excision during human DNA mismatch repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 12, p. 3281-3286, 2016.

JETER, J. M.; KOHLMANN, W.; GRUBER, S. B. Genetics of colorectal cancer. **Oncology (Williston Park, NY)**, v. 20, n. 3, p. 269-76, 2006.

JOHN, E. M. et al. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of seven US case-control studies. Epithelial ovarian cancer in black women. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 2, p. 142-147, 1993.

JONSSON, F. et al. Obesity and hormone-dependent tumors: Cohort and co-twin control studies based on the Swedish Twin Registry. **International journal of cancer**, v. 106, n. 4, p. 594-599, 2003.

JORDAN, S. J. et al. Has the association between hysterectomy and ovarian cancer changed over time? A systematic review and meta-analysis. **European journal of cancer**, v. 49, n. 17, p. 3638-3647, 2013.

JORDAN, S. J. et al. Serous ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancers: a comparative epidemiological analysis. **International journal of cancer**, v. 122, n. 7, p. 1598-1603, 2008.

JORDAN, S. J.; WEBB, P. M.; GREEN, A. C. Height, age at menarche, and risk of epithelial ovarian cancer. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 14, n. 8, p. 2045-2048, 2005.

JU, J. Y. et al. Universal Lynch syndrome screening should be performed in all upper tract urothelial carcinomas. **The American journal of surgical pathology**, v. 42, n. 11, p. 1549-1555, 2018.

JIRICNY, J. Postreplicative mismatch repair. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 4, p. a012633, 2013.

KADYROV, F. A. et al. Endonucleolytic function of MutL α in human mismatch repair. **Cell**, v. 126, n. 2, p. 297-308, 2006.

KALADY, M. F. et al. Defining the adenoma burden in lynch syndrome. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 58, n. 4, p. 388-392, 2015.

KHALIQUE, S. et al. Optimised ARID1A immunohistochemistry is an accurate predictor of ARID1A mutational status in gynaecological cancers. **The Journal of Pathology: Clinical Research**, v. 4, n. 3, p. 154-166, 2018.

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

KASTRINOS, F. et al. Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. **Jama**, v. 302, n. 16, p. 1790-1795, 2009.

KATABUCHI, H. (Ed.). *Frontiers in ovarian cancer science*. Springer, 2017.

KEMPERS, M. JE et al. Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study. **The lancet oncology**, v. 12, n. 1, p. 49-55, 2011

KERR, S. E. et al. Matching maternal isodisomy in mucinous carcinomas and associated ovarian teratomas provides evidence of germ cell derivation for some mucinous ovarian tumors. **The American journal of surgical pathology**, v. 37, n. 8, p. 1229-1235, 2013.

KETABI, Z. et al. Ovarian cancer linked to Lynch syndrome typically presents as early-onset, non-serous epithelial tumors. **Gynecologic oncology**, v. 121, n. 3, p. 462-465, 2011.

KIM, J. et al. Cell origins of high-grade serous ovarian cancer. **Cancers**, v. 10, n. 11, p. 433, 2018.

KIM, S. J. et al. Epidemiologic factors that predict long-term survival following a diagnosis of epithelial ovarian cancer. **British journal of cancer**, v. 116, n. 7, p. 964-971, 2017.

KIM, S. R. et al. Performance characteristics of screening strategies to identify Lynch syndrome in women with ovarian cancer. **Cancer**, v. 126, n. 22, p. 4886-4894, 2020

KINDELBERGER, D. W. et al. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: evidence for a causal relationship. **The American journal of surgical pathology**, v. 31, n. 2, p. 161-169, 2007.

KING, B. L. et al. Microsatellite instability in ovarian neoplasms. **British journal of cancer**, v. 72, n. 2, p. 376-382, 1995.

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

KONONEN, J. et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nature medicine**, v. 4, n. 7, p. 844-847, 1998.

KORNBERG, A. et al. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid, XVI. Oligonucleotides as templates and the mechanism of their replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 51, n. 2, p. 315, 1964.

- KOSHIYAMA, M.; MATSUMURA, N.; KONISHI, I. Recent concepts of ovarian carcinogenesis: type I and type II. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
- KOUSHIK, A. et al. Hormonal and reproductive factors and the risk of ovarian cancer. **Cancer Causes & Control**, v. 28, n. 5, p. 393-403, 2017.
- KUIPER, R. P. et al. Recurrence and variability of germline EPCAM deletions in Lynch syndrome. **Human mutation**, v. 32, n. 4, p. 407-414, 2011.
- KUNKEL, T. A. DNA replication fidelity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 17, p. 16895-16898, 2004.
- KURMAN, R. J; CARCANGIU, M. L; HERRINGTON, S; YOUNG, R. H. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. IARC: Lyon, 2014.
- KVASKOFF, M. et al. Endometriosis: a high-risk population for major chronic diseases?. **Human reproduction update**, v. 21, n. 4, p. 500-516, 2015.
- LABIDI-GALY, S. Intidhar et al. High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2017.
- LAGHI, L.; BIANCHI, P.; MALESCI, A. Differences and evolution of the methods for the assessment of microsatellite instability. **Oncogene**, v. 27, n. 49, p. 6313-6321, 2008.
- LAHUE, R. S.; MODRICH, P. Methyl-directed DNA mismatch repair in Escherichia coli. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 198, n. 1, p. 37-43, 1988.
- LANCASTER, J. M. et al. Society of Gynecologic Oncology statement on risk assessment for inherited gynecologic cancer predispositions. **Gynecologic oncology**, v. 136, n. 1, p. 3-7, 2015.
- LÄNGLE-ROUAULT, F.; MAENHAUT-MICHEL, G.; RADMAN, M. GATC sequences, DNA nicks and the MutH function in Escherichia coli mismatch repair. **The EMBO journal**, v. 6, n. 4, p. 1121-1127, 1987.
- LATHAM, A. et al. Microsatellite instability is associated with the presence of Lynch syndrome pan-cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 4, p. 286, 2019.
- LEE, A. W. et al. Evidence of a genetic link between endometriosis and ovarian cancer. **Fertility and sterility**, v. 105, n. 1, p. 35-43. e10, 2016.
- LEE, JH. et al. Association between IHC and MSI testing to identify mismatch repair-deficient patients with ovarian cancer. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 18, n. 4, p. 229-235, 2014.
- LEE, Y. et al. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 211, n. 1, p. 26-35, 2007.
- LEENEN, C. HM et al. Prospective evaluation of molecular screening for Lynch syndrome in patients with endometrial cancer ≤ 70 years. **Gynecologic oncology**, v. 125, n. 2, p. 414-420, 2012.

LI, F. et al. The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutS α . **Cell**, v. 153, n. 3, p. 590-600, 2013.

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

LI, GM. DNA mismatch repair and cancer. **Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library**, v. 8, p. d997-1017, 2003.

LI, GM. Decoding the histone code: role of H3K36me3 in mismatch repair and implications for cancer susceptibility and therapy. **Cancer research**, v. 73, n. 21, p. 6379-6383, 2013.

LIBERA, L. et al. Microsatellite analysis of sporadic and hereditary gynaecological cancer in routine diagnostics. **Journal of clinical pathology**, v. 70, n. 9, p. 792-797, 2017.

LISIO, MA. et al. High-grade serous ovarian cancer: basic sciences, clinical and therapeutic standpoints. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 4, p. 952, 2019.

LIU, D.; KEIJZERS, G.; RASMUSSEN, L. J. DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 773, p. 174-187, 2017.

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. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 24, p. 4934-4943, 2004.

LOVEDAY, C. et al. Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer. **Nature genetics**, v. 43, n. 9, p. 879-882, 2011.

LU, K. et al. Gynecological malignancy as a “sentinel cancer” for women with HNPCC. **Gynecology Oncology**, v. 92, p.421, 2004.

LU, K. H.; DANIELS, M. Endometrial and ovarian cancer in women with Lynch syndrome: update in screening and prevention. **Familial cancer**, v. 12, n. 2, p. 273-277, 2013.

LU, Z. et al. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 12, p. 3917-3929, 2008.

LUNDHOLM, C. et al. Hysterectomy on benign indications in Sweden 1987–2003: a nationwide trend analysis. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 88, n. 1, p. 52-58, 2009.

LYNCH, H. T. et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Navajo Indian family. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 15, n. 3-4, p. 209-213, 1985.

LYNCH, H. T.; LANSPA, S.; SMYRK, T. et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch LYNCH, Henry T. et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I & II): genetics, pathology, natural history, and cancer control, Part I. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 53, n. 2, p. 143-160, 1991.

LYNCH, H. T.; LYNCH, J. F. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II): a common genotype linked to oncogenes?. **Medical hypotheses**, v. 18, n. 1, p. 19-28, 1985.

LYNCH, H. T. et al. Hereditary factors in cancer: study of two large midwestern kindreds. **Archives of internal medicine**, v. 117, n. 2, p. 206-212, 1966.

LYNCH, H. T. et al. Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. **Molecular oncology**, v. 3, n. 2, p. 97-137, 2009.

LYNCH, H. T. et al. Milestones of Lynch syndrome: 1895–2015. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 3, p. 181-194, 2015.

LYNCH, H. T. The cancer family syndrome and cancer control. **Surgery, Gynecology and Obstetrics**, v. 132, p. 247-250, 1971.

LYNCH, H. T.; DE LA CHAPELLE, Albert. Hereditary colorectal cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 10, p. 919-932, 2003.

LYNCH, H. T.; KRUSH, A. J. Cancer family “G” revisited: 1895-1970. **Cancer**, v. 27, n. 6, p. 1505-1511, 1971.

LYNCH, P. M.; LYNCH, H. T.; HARRIS, R. E. Hereditary proximal colonic cancer. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 20, n. 8, p. 661-668, 1977.

MALANDER, S. et al. The contribution of the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome to the development of ovarian cancer. **Gynecologic oncology**, v. 101, n. 2, p. 238-243, 2006.

MALMBERG, K. et al. Serous tubal intraepithelial carcinoma, chronic fallopian tube injury, and serous carcinoma development. **Virchows Archiv**, v. 468, n. 6, p. 707-713, 2016.

MAVADDAT, N. et al. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 21, n. 1, p. 134-147, 2012.

MAZUR, D. J.; MENDILLO, M. L.; KOLODNER, R. D. Inhibition of Msh6 ATPase activity by mispaired DNA induces a Msh2 (ATP)-Msh6 (ATP) state capable of hydrolysis-independent movement along DNA. **Molecular cell**, v. 22, n. 1, p. 39-49, 2006.

MCCULLOCH, S. D.; GU, L.; LI, GM. Bi-directional processing of DNA loops by mismatch repair-dependent and-independent pathways in human cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 6, p. 3891-3896, 2003.

MECHANIC, L. E.; FRANKEL, B. A.; MATSON, S. W. Escherichia coli MutL loads DNA helicase II onto DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 49, p. 38337-38346, 2000.

MEINDL, A. et al. Mutações da linha germinativa em linhagens de câncer de mama e ovário estabelecem RAD51C como um gene de susceptibilidade ao câncer humano. **Nature genetics**, v. 42, n. 5, p. 410-414, 2010.

MERRITT, M. A. et al. Reproductive characteristics in relation to ovarian cancer risk by histologic pathways. **Human reproduction**, v. 28, n. 5, p. 1406-1417, 2013.

MERRITT, M. A. et al. Talcum powder, chronic pelvic inflammation and NSAIDs in relation to risk of epithelial ovarian cancer. **International journal of cancer**, v. 122, n. 1, p. 170-176, 2008.

MILLS, P. K.; RIORDAN, D. G.; CRESS, R. D. Epithelial ovarian cancer risk by invasiveness and cell type in the Central Valley of California. **Gynecologic oncology**, v. 95, n. 1, p. 215-225, 2004.

MIRANDA, T. B.; JONES, P. A. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. **Journal of cellular physiology**, v. 213, n. 2, p. 384-390, 2007.

MIYAKI, M. et al. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Nature genetics**, v. 17, n. 3, p. 271-272, 1997.

MODRICH, P. Methyl-directed DNA mismatch correction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 12, p. 6597-6600, 1989.

MONTI, M. C. et al. Native mass spectrometry provides direct evidence for DNA mismatch-induced regulation of asymmetric nucleotide binding in mismatch repair protein MutS. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 18, p. 8052-8064, 2011.

MOORMAN, P. G. et al. Ovarian cancer risk factors in African-American and white women. **American journal of epidemiology**, v. 170, n. 5, p. 598-606, 2009.

MORRIS, J. K. et al. Insulin-like growth factors and cancer: no role in screening. Evidence from the BUPA study and meta-analysis of prospective epidemiological studies. **British journal of cancer**, v. 95, n. 1, p. 112-117, 2006.

MOVAHEDI, M. et al. Obesity, aspirin, and risk of colorectal cancer in carriers of hereditary colorectal cancer: a prospective investigation in the CAPP2 study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 31, p. 3591-3597, 2015.

MUKHERJEE, S.; RIDGEWAY, A.; LAMB, D. J. DNA mismatch repair and infertility. **Current opinion in urology**, v. 20, n. 6, p. 525, 2010.

MVUNDURA, M. et al. The cost-effectiveness of genetic testing strategies for Lynch syndrome among newly diagnosed patients with colorectal cancer. **Genetics in Medicine**, v. 12, n. 2, p. 93-104, 2010.

NAGLE, C. M. et al. Endometrioid and clear cell ovarian cancers—A comparative analysis of risk factors. **European journal of cancer**, v. 44, n. 16, p. 2477-2484, 2008.

NAKAMURA, K. et al. Features of ovarian cancer in Lynch syndrome. **Molecular and clinical oncology**, v. 2, n. 6, p. 909-916, 2014.

NAROD, S. Can advanced-stage ovarian cancer be cured?. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 13, n. 4, p. 255, 2016.

NCCN. Guidelines Version Updates Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal. Versão **3.2017**. Disponível em: <https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_colon.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2021.

NESS, R. B. et al. Contraception methods, beyond oral contraceptives and tubal ligation, and risk of ovarian cancer. **Annals of epidemiology**, v. 21, n. 3, p. 188-196, 2011.

NESS, R. B. et al. Racial differences in ovarian cancer risk. **Journal of the National Medical Association**, v. 92, n. 4, p. 176, 2000.

NETO, N.; CUNHA, T. M. Do hereditary syndrome-related gynecologic cancers have any specific features?. **Insights into imaging**, v. 6, n. 5, p. 545-552, 2015

NEZHAT, F. R. et al. New insights in the pathophysiology of ovarian cancer and implications for screening and prevention. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 213, n. 3, p. 262-267, 2015.

NICOLAIDES, N. C. et al. Mutations of two P/WS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. **Nature**, v. 371, n. 6492, p. 75-80, 1994.

NIELSEN, F. C.; VAN OVEREEM HANSEN, T.; SØRENSEN, C. S. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 9, p. 599-612, 2016.

NISKAKOSKI, A. et al. Distinct molecular profiles in Lynch syndrome-associated and sporadic ovarian carcinomas. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 11, p. 2596-2608, 2013.

NORQUIST, B. M. et al. Inherited mutations in women with ovarian carcinoma. **JAMA oncology**, v. 2, n. 4, p. 482-490, 2016.

NUNNEY, L. Size matters: height, cell number and a person's risk of cancer. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 285, n. 1889, p. 20181743, 2018.

OJALVO, L. S. et al. Tumor-associated macrophages and the tumor immune microenvironment of primary and recurrent epithelial ovarian cancer. **Human pathology**, v. 74, p. 135-147, 2018.

OLSEN, C. M. et al. Obesity and risk of ovarian cancer subtypes: evidence from the Ovarian Cancer Association Consortium. **Endocrine-related cancer**, v. 20, n. 2, p. 251-262, 2013.

PAGIN, A. et al. Evaluation of a new panel of six mononucleotide repeat markers for the detection of DNA mismatch repair-deficient tumours. **British journal of cancer**, v. 108, n. 10, p. 2079-2087, 2013.

PAL, T. et al. Systematic review and meta-analysis of ovarian cancers: estimation of microsatellite-high frequency and characterization of mismatch repair deficient tumor histology. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 21, p. 6847-6854, 2008.

PAPADOPOULOS, N. et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. **Science**, v. 263, n. 5153, p. 1625-1629, 1994.

PARK, SJ. et al. Frequent CpG island methylation in serrated adenomas of the colorectum. **The American journal of pathology**, v. 162, n. 3, p. 815-822, 2003.

PATIL, D. T. et al. A five-marker panel in a multiplex PCR accurately detects microsatellite instability-high colorectal tumors without control DNA. **Diagnostic Molecular Pathology**, v. 21, n. 3, p. 127-133, 2012.

PAULSEN, M.; FERGUSON-SMITH, A. C. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. **The Journal of pathology**, v. 195, n. 1, p. 97-110, 2001.

PEARCE, C. L. et al. Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. **The lancet oncology**, v. 13, n. 4, p. 385-394, 2012.

PEĆINA-ŠLAUS, N. et al. Mismatch repair pathway, genome stability and cancer. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 7, p. 122, 2020.

PELTOMAKI, P. et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. **Science**, v. 260, n. 5109, p. 810-812, 1993.

PELTOMÄKI, P. et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. **Cancer research**, v. 53, n. 24, p. 5853-5855, 1993.

PELUCCHI, C. et al. Lifetime ovulatory cycles and ovarian cancer risk in 2 Italian case-control studies. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 196, n. 1, p. 83. e1-83, 2007.

PENNINKILAMPI, Ross; ESLICK, Guy D. Perineal talc use and ovarian cancer. **Epidemiology**, v. 29, n. 1, p. 41-49, 2018.

PERES, L. C. et al. Premenopausal hysterectomy and risk of ovarian cancer in African-American women. **American journal of epidemiology**, v. 186, n. 1, p. 46-53, 2017.

PÉREZ-CARBONELL, L. et al. Comparison between universal molecular screening for Lynch syndrome and revised Bethesda guidelines in a large population-based cohort of patients with colorectal cancer. **Gut**, v. 61, n. 6, p. 865-872, 2012.

PHELAN, C. M. et al. Identification of 12 new susceptibility loci for different histotypes of epithelial ovarian cancer. **Nature genetics**, v. 49, n. 5, p. 680-691, 2017.

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

PLUCIENNIK, A. et al. PCNA function in the activation and strand direction of MutL α endonuclease in mismatch repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 37, p. 16066-16071, 2010.

PONTI, G.; DE LEON, M. P. Muir-torre syndrome. **The lancet oncology**, v. 6, n. 12, p. 980-987, 2005.

PRENDERGAST, G. C.; LAWE, D.; ZIFF, E. B. Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. **Cell**, v. 65, n. 3, p. 395-407, 1991.

PUTNAM, C. D. Evolution of the methyl directed mismatch repair system in Escherichia coli. **DNA repair**, v. 38, p. 32-41, 2016.

RAMBAU, P. F. et al. Significant frequency of MSH2/MSH6 abnormality in ovarian endometrioid carcinoma supports histotype-specific Lynch syndrome screening in ovarian carcinomas. **Histopathology**, v. 69, n. 2, p. 288-297, 2016.

RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Veterinary pathology**, v. 42, n. 4, p. 405-426, 2005.

RAMUS, S. J. et al. Germline mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN genes in women with ovarian cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 11, 2015.

REIS, A. P.; MACHADO, J. Imunoterapia no câncer – inibidores do checkpoint imunológico, Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia, v. 4, n. 1, p.72-77, 2020.

REYES, G. X. et al. New insights into the mechanism of DNA mismatch repair. **Chromosoma**, v. 124, n. 4, p. 443-462, 2015.

RICE, M. S.; HANKINSON, S. E.; TWOROGGER, S. S. Tubal ligation, hysterectomy, unilateral oophorectomy, and risk of ovarian cancer in the Nurses' Health Studies. **Fertility and sterility**, v. 102, n. 1, p. 192-198. e3, 2014.

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

RIMAN, T. et al. Risk factors for epithelial borderline ovarian tumors: results of a Swedish case–control study. **Gynecologic oncology**, v. 83, n. 3, p. 575-585, 2001.

RIMAN, T.; NILSSON, S.; PERSSON, I. R. Review of epidemiological evidence for reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 83, n. 9, p. 783-795, 2004.

RODRIGUEZ-BIGAS, M. A. et al. A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 23, p. 1758-1762, 1997.

ROSA, R. C. A. et al. Lynch syndrome identification in a Brazilian cohort of endometrial cancer screened by a universal approach. **Gynecologic Oncology**, v. 159, n. 1, p. 229-238, 2020.

ROSSETI, M. L.; SILVA, C. M. D. D; RODRIGUES, J. J. S. Doenças infecciosas: diagnóstico molecular. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2006.

RYAN, N. A. J. et al. Pathological features and clinical behavior of Lynch syndrome-associated ovarian cancer. **Gynecologic oncology**, v. 144, n. 3, p. 491-495, 2017.

SANNE, W. et al. Cancer risks for PMS2-associated Lynch syndrome. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 29, p. 2961, 2018.

SARODE, V. R.; ROBINSON, L. Screening for Lynch Syndrome by immunohistochemistry of mismatch repair proteins: significance of indeterminate result and correlation with mutational studies. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 143, n. 10, p. 1225-1233, 2019.

SAXONOV, S.; BERG, P.; BRUTLAG, D. L. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 5, p. 1412-1417, 2006.

SCHRADER, C. E. et al. Activation-induced cytidine deaminase-dependent DNA breaks in class switch recombination occur during G1 phase of the cell cycle and depend upon mismatch repair. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 9, p. 6064-6071, 2007.

SCHÜLER, S. et al. Ovarian epithelial tumors and reproductive factors: a systematic review. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 287, n. 6, p. 1187-1204, 2013.

SEIDMAN, J. D. et al. Epithelial Tumors of the Ovary. In: KURMAN R. et al. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. **Springer, Cham**. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46334-6_14, 2019.

SELMANE, T. et al. Formation of a DNA mismatch repair complex mediated by ATP. **Journal of molecular biology**, v. 334, n. 5, p. 949-965, 2003.

SEPESI, B. et al. Programmed death cell ligand 1 (pd-11) is associated with survival in stage I non-small cell lung cancer. In: **Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery**. WB Saunders, 2017. p. 408-415.

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. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 11, n. 4, p. 266-278, 2009.

SGO. Society of Gynecologic; Committee on Practice B-G O. ACOG Practice Bulletin No. 147: Lynch syndrome. **Obstetrics & Gynecology**. v. 124, p. 1042–1054, 2014.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 27-36, 2010.

SHIA, J. et al. Value of histopathology in predicting microsatellite instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic colorectal cancer. **The American journal of surgical pathology**, v. 27, n. 11, p. 1407-1417, 2003.

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. **The Journal of molecular diagnostics**, v. 10, n. 4, p. 293-300, 2008.

SHIH, IM; KURMAN, R. J. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. **The American journal of pathology**, v. 164, n. 5, p. 1511-1518, 2004.

SHIH, YC. et al. No evidence for microsatellite instability from allelotype analysis of benign and low malignant potential ovarian neoplasms. **Gynecologic oncology**, v. 69, n. 3, p. 210-213, 1998.

SHILPA, V. et al. Microsatellite instability, promoter methylation and protein expression of the DNA mismatch repair genes in epithelial ovarian cancer. **Genomics**, v. 104, n. 4, p. 257-263, 2014.

SILVA, F. C, et al. Clinical and molecular characterization of Brazilian patients suspected to have Lynch syndrome. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0139753, 2015.

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

SINGER, G. et al. Different types of microsatellite instability in ovarian carcinoma. **International journal of cancer**, v. 112, n. 4, p. 643-646, 2004.

SLOAN, E. A. et al. PD-L1 expression in mismatch repair-deficient endometrial carcinomas, including lynch syndrome-associated and MLH1 promoter hypermethylated tumors. **The American journal of surgical pathology**, v. 41, n. 3, p. 326-333, 2017.

SOOD, A. K. et al. Application of the National Cancer Institute international criteria for determination of microsatellite instability in ovarian cancer. **Cancer research**, v. 61, n. 11, p. 4371-4374, 2001.

SOOD, A. K.; BULLER, R. E. Genomic instability in ovarian cancer: a reassessment using an arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Oncogene**, v. 13, n. 11, p. 2499-2504, 1996.

SPILSBURY, K. et al. Persistent high rates of hysterectomy in Western Australia: a population-based study of 83 000 procedures over 23 years. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 113, n. 7, p. 804-809, 2006.

STEINKE, V. et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)/Lynch syndrome. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 110, n. 3, p. 32, 2013.

STENZEL, A. E.; BUAS, M. F.; MOYSICH, K. B. Survival disparities among racial/ethnic groups of women with ovarian cancer: An update on data from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) registry. **Cancer epidemiology**, v. 62, p. 101580, 2019.

STRATHDEE, G. et al. Primary ovarian carcinomas display multiple methylator phenotypes involving known tumor suppressor genes. **The American journal of pathology**, v. 158, n. 3, p. 1121-1127, 2001.

- STRATHDEE, G. et al. A role for methylation of the hMLH1 promoter in loss of hMLH1 expression and drug resistance in ovarian cancer. **Oncogene**, v. 18, n. 14, p. 2335-2341, 1999.
- SUPEK, F.; LEHNER, B. Differential DNA mismatch repair underlies mutation rate variation across the human genome. **Nature**, v. 521, n. 7550, p. 81-84, 2015.
- SURAWEERA, N. et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. **Gastroenterology**, v. 123, n. 6, p. 1804-1811, 2002.
- TAHER, Mohamed Kadry et al. Critical review of the association between perineal use of talc powder and risk of ovarian cancer. **Reproductive Toxicology**, v. 90, p. 88-101, 2019.
- TAJIMA, Y. et al. Prevalence and molecular characteristics of defective mismatch repair epithelial ovarian cancer in a Japanese hospital-based population. **Japanese journal of clinical oncology**, v. 48, n. 8, p. 728-735, 2018.
- TAKAI, D.; JONES, P. A. The CpG island searcher: a new WWW resource. **In silico biology**, v. 3, n. 3, p. 235-240, 2003.
- TAKEDA, T. et al. Screening for Lynch syndrome using risk assessment criteria in patients with ovarian cancer. **Journal of gynecologic oncology**, v. 29, n. 3, 2018.
- TANG, S. et al. Frequency of serous tubal intraepithelial carcinoma in various gynecologic malignancies: a study of 300 consecutive cases. **International journal of gynecological pathology**, v. 31, n. 2, p. 103-110, 2012.
- TANGIR, J. et al. Frequent microsatellite instability in epithelial borderline ovarian tumors. **Cancer research**, v. 56, n. 11, p. 2501-2505, 1996.
- THERKILDSEN, C. et al. Towards gene-and gender-based risk estimates in Lynch syndrome; age-specific incidences for 13 extra-colorectal cancer types. **British journal of cancer**, v. 117, n. 11, p. 1702-1710, 2017.
- THIBODEAU, S. N.; BREN, G.; SCHAID, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. **Science**, v. 260, n. 5109, p. 816-819, 1993.
- TOMLINSON, I. et al. Does MSI-low exist?. **The Journal of pathology**, v. 197, n. 1, p. 6-13, 2002.
- TORRE, L. A. et al. Ovarian cancer statistics, 2018. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 4, p. 284-296, 2018.
- TRILLSCH, F. et al. Clinical management of borderline ovarian tumors. **Expert review of anticancer therapy**, v. 10, n. 7, p. 1115-1124, 2010.
- TRIMBLE, C. L.; TRIMBLE, E. L. Ovarian tumors of low malignant potential. **Oncology (Williston Park, NY)**, v. 17, n. 11, p. 1563-1567, 2003.
- TROPÉ, C. G.; KAERN, J.; DAVIDSON, B. Borderline ovarian tumours. **Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 26, n. 3, p. 325-336, 2012.

TUTLEWSKA, K.; LUBINSKI, J.; KURZAWSKI, G. Germline deletions in the EPCAM gene as a cause of Lynch syndrome—literature review. **Hereditary cancer in clinical practice**, v. 11, n. 1, p. 9, 2013.

UMAR, A. et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 4, p. 261-268, 2004.

URSO, E. et al. Soft tissue sarcoma and the hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome: formulation of an hypothesis. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 10, p. 9307-9310, 2012.

VAN DUIJNHOFEN, F. JB. et al. Do lifestyle factors influence colorectal cancer risk in Lynch syndrome?. **Familial cancer**, v. 12, n. 2, p. 285-293, 2013.

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. et al. The international collaborative group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 34, n. 5, p. 424-425, 1991.

VASEN, H. F. A. The Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 26, p. 113-126, 2007.

VENTRIGLIA, J. et al. Immunotherapy in ovarian, endometrial and cervical cancer: state of the art and future perspectives. **Cancer treatment reviews**, v. 59, p. 109-116, 2017.

VESSEY, M.; YEATES, D.; FLYNN, S. Factors affecting mortality in a large cohort study with special reference to oral contraceptive use. **Contraception**, v. 82, n. 3, p. 221-229, 2010.

WAGNER, R.; MESELSON, M. Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 11, p. 4135-4139, 1976.

WALKER, J. L. et al. Society of Gynecologic Oncology recommendations for the prevention of ovarian cancer. **Cancer**, v. 121, n. 13, p. 2108-2120, 2015.

WANG, C. et al. The association between endometriosis, tubal ligation, hysterectomy and epithelial ovarian cancer: meta-analyses. **International journal of environmental research and public health**, v. 13, n. 11, p. 1138, 2016.

WANG, M. et al. Genetic testing for Lynch syndrome in the province of Ontario. **Cancer**, v. 122, n. 11, p. 1672-1679, 2017.

WANG, Y.; LEUNG, F. CC. An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. **Bioinformatics**, v. 20, n. 7, p. 1170-1177, 2004.

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. **Archives of internal medicine**, v. 12, n. 5, p. 546-555, 1913.

WATSON, P.; LYNCH, H. T. The tumor spectrum in HNPCC. **Anticancer research**, v. 14, n. 4B, p. 1635-1639, 1994.

WATSON, P. et al. The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. **International journal of cancer**, v. 123, n. 2, p. 444-449, 2008.

WEBER-LASSALLE, N. et al. BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 20, n. 1, p. 1-6, 2018.

WENDEL, J. R. H.; WANG, X.; HAWKINS, S. M. The endometriotic tumor microenvironment in ovarian cancer. **Cancers**, v. 10, n. 8, p. 261, 2018.

WENTZENSEN, N. et al. Ovarian cancer risk factors by histologic subtype: an analysis from the ovarian cancer cohort consortium. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 24, p. 2888, 2016.

WERNER, M. et al. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. **The American journal of surgical pathology**, v. 24, n. 7, p. 1016-1019, 2000.

WHELAN, A. J. et al. MSI in endometrial carcinoma: absence of MLH1 promoter methylation

WIESER, V. et al. BRCA1/2 and TP53 mutation status associates with PD-1 and PD-L1 expression in ovarian cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 25, p. 17501, 2018.

WILDENBERG, J.; MESELSON, M. Mismatch repair in heteroduplex DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 6, p. 2202-2206, 1975.

WIN, A. K. et al. Determining the frequency of de novo germline mutations in DNA mismatch repair genes. **Journal of medical genetics**, v. 48, n. 8, p. 530-534, 2011.

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.

WOOLDERINK, J. M. et al. Characteristics of Lynch syndrome associated ovarian cancer. **Gynecologic oncology**, v. 150, n. 2, p. 324-330, 2018.

WU, A. H. et al. African Americans and hispanics remain at lower risk of ovarian cancer than non-hispanic whites after considering nongenetic risk factors and oophorectomy rates. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 24, n. 7, p. 1094-1100, 2015.

XIAO, X. et al. Mismatch repair deficiency is associated with MSI phenotype, increased tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in immune cells in ovarian cancer. **Gynecologic oncology**, v. 149, n. 1, p. 146-154, 2018.

XICOLA, R. M. et al. Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 3, p. 244-252, 2007.

YAMADA, N. A. et al. Relative rates of insertion and deletion mutations in dinucleotide repeats of various lengths in mismatch repair proficient mouse and mismatch repair deficient human cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 499, n. 2, p. 213-225, 2002.

YANG, HS. et al. Effect of obesity on survival of women with epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **International Journal of Gynecologic Cancer**, v. 21, n. 9, p. 1525-1532, 2011.

YOU, J. F. et al. Tumours with loss of MSH6 expression are MSI-H when screened with a pentaplex of five mononucleotide repeats. **British journal of cancer**, v. 103, n. 12, p. 1840-1845, 2010.

YURGELUN, M. B. et al. Cancer susceptibility gene mutations in individuals with colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 10, p. 1086, 2017.

ZAMORANO, A. S. et al. Pre-diagnosis body mass index, physical activity and ovarian cancer mortality. **Gynecologic oncology**, v. 155, n. 1, p. 105-111, 2019.

ZAPARDIEL, I. et al. The role of restaging borderline ovarian tumors: single institution experience and review of the literature. **Gynecologic oncology**, v. 119, n. 2, p. 274-277, 2010.

ZHANG, S. et al. Both fallopian tube and ovarian surface epithelium are cells-of-origin for high-grade serous ovarian carcinoma. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2019.

ZHU, J. et al. Prognostic value of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in ovarian clear cell carcinoma. **Journal of gynecologic oncology**, v. 28, n. 6, 2017.