



A.C. Camargo Cancer Center

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Fundação Antônio Prudente

Área de Oncologia

Postgraduate Course in Sciences of Fundação Antônio Prudente

Area of Oncology

**Estudo imuno-histoquímico e classificação molecular dos
adenocarcinomas de endométrio com expressão
heterogênea dos genes de reparo do DNA.**

Immunohistochemical study and molecular classification of endometrial adenocarcinomas
with heterogeneous expression of DNA repair genes.

Apresentação projeto ()

Apresentação 1º Relatório ()

Apresentação 2º Relatório ()

Exemplar final da tese (defesa) ()

Exemplar final pós-defesa (X)

Pós-Graduanda: Grazielle Bovolim

Nível: Doutorado

Orientador: Louise De Brot Andrade

Co-Orientadores: Glauco Baiocchi Neto e Dirce Maria Carraro

São Paulo, março de 2022

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio de auxílio à Pesquisa (2019/03197-6).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, em especial ao meu marido, Gabriel Domingos De Paula, por todo apoio e compreensão durante os quatro anos de construção do trabalho.

Meu filho, Luís Francisco, com seu sorriso lindo e brincalhão, que me enchia de alegria nos dias em que chegava cansada e me distraía com suas brincadeiras e conversas de criança. Dedico também à minha filha, que está em meu ventre, Aurora, tão pequena, mas que já faz parte de toda essa história, que foi gerada no meio deste projeto e que nos trouxe muita alegria.

Dedico também aos meus familiares, principalmente minha mãe, Zenaide Bovolim, que me entendia em todas as horas difíceis, por já ter passado por isso na construção do seu mestrado. Amo todos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas envolvidas na construção e finalização do trabalho.

Dra. Louise De Brot Andrade – Médica patologista do departamento de Patologia – AC Camargo Cancer Center.

Sara Oliveira da Silva – Bióloga do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular – AC Camargo Cancer Center.

Bruna Tirapelli Gonçalves – Enfermeira de pesquisa – AC Camargo Cancer Center.

Giovana Tardin Torrezan – Pesquisadora do Centro internacional de pesquisa (CIPE) – AC Camargo Cancer Center

Dr. Alexandre André Balieiro Anastácio Da Costa – Médico do departamento de Oncologia clínica – AC Camargo Cancer Center.

Dirce Maria Carraro – Laboratório de Genômica e Biologia Molecular – AC Camargo Cancer Center.

Dr. Glauco Baiocchi – Médico e Líder do Centro de Referência de Tumores Ginecológicos – AC Camargo Cancer Center

Em especial, agradeço imensamente a minha orientadora Dra. Louise De Brot Andrade que atuou intensamente em toda construção, elaboração e redação do projeto.

Sara Oliveira da Silva e Giovana Tardin Torrezan, também um carinho especial em toda construção de dados moleculares.

Bruna Tirapelli Gonçalves, muito importante no levantamento dos dados clínicos e cirúrgicos das pacientes estudadas.

Dr. Glauco Baiocchi, que atuou intensamente na construção de toda a estatística, incluindo a interpretação dos dados e orientação de algoritmos.

RESUMO

Introdução: O carcinoma endometrial (CE) foi classificado pelo sistema de Bokhman em tipos I e II com base em observações clínicas e epidemiológicas. O tipo I corresponde aos tumores de baixo grau e o tipo II aos tumores de alto grau. Adicionalmente, estudos recentes propuseram que a classificação também fosse baseada em aspectos histológicos e moleculares com base nos dados do TCGA (*The Cancer Genome Atlas*). Foram identificados quatro grupos moleculares distintos de CE: (1) com mutações no *POLE* (fenótipo "ultramutado"), (2) "alto número de cópias" (mutações em TP53), (3) "baixo número de cópias" (em que os tumores não apresentam nenhuma das alterações descritas nos outros tipos) e (4) tumores com predomínio de instabilidade de microssatélites. A imunohistoquímica (IHC) para proteínas do gene de reparo é usada para identificar a deficiência de genes de reparo do DNA (Mismatch Repair – MMR) associada à instabilidade de microssatélites (MSI). A coloração nuclear positiva representa a expressão retida de proteínas MMR, enquanto a perda completa representa deficiência de MMR. O padrão de expressão heterogênea (HEP), ou seja, concomitância em um mesmo espécime de áreas positivas e totalmente negativas tem sido observada em CE. No presente momento, as principais diretrizes determinam que a presença de HEP seja interpretada como expressão retida de proteínas MMR. Não há, porém, consenso quanto à classificação e interpretação de HEP, nem conhecimento do impacto da classificação de HEP como subtipo molecular diferente em relação às características clínicas e prognósticas. **Objetivos:** realizar a classificação molecular dos casos de CE com HEP das proteínas relacionadas aos genes de reparo do DNA e comparação do perfil molecular entre áreas positivas e negativas no estudo imunohistoquímico. **Materiais e Métodos:** De janeiro/2007 a dezembro/2017 foram identificados 356 casos de CE, 16 deles com HEP. A classificação molecular foi feita com base no protocolo

PROMISE para CE. Cada área (expressão retida ou perdida) foi macrodissecada e o status molecular foi avaliado separadamente quanto ao status MSI (Idylla), metilação do promotor MLH1 (NGS - ponto de corte para positividade $\geq 15\%$), status POLE (NGS) e status p53 (IHC). Variáveis clínicas e patológicas também foram avaliadas e correlacionadas com cada caso. **Resultados:** A histologia endometrióide foi predominante (15 casos), bem como ausência de invasão linfovascular (11 casos), ausência de padrão MELF (10 casos), graus FIGO 1 e 2 (13 casos), invasão miometrial $< 50\%$ (13 casos) e estadiamento T1 (13 casos). Todos os pacientes estavam vivos e sem evidência de doença no último acompanhamento, exceto por um caso, cujo status de sobrevivência era desconhecido. Dois casos que seriam descritos como apresentando expressão retida de proteínas relacionadas a genes de reparo do DNA por IHC apresentaram-se na análise molecular com instabilidade de microssatélites (MSI-H). Nos casos de HEP, a proteína MSH6 foi a mais frequentemente envolvida (9 casos, 7 isolados). A proteína MLH1 apresentou-se alterada em 6 casos, sendo a única proteína associada a co-alterações (com MSH6 e PMS2). Seis casos apresentaram-se metilados por MLH1, padrão encontrado tanto em áreas com perda quanto em áreas com retenção das proteínas relacionadas a MMR por IHC e dois casos apresentaram metilação em apenas uma das áreas. Em relação ao status de POLE, 6 casos apresentaram mutação, 2 com mutações tanto em áreas com perda quanto em áreas com retenção de expressão, 3 apenas na área com perda e 1 apenas na área com retenção. Dois casos apresentam padrão aberrante de p53 (MSH6 alterados) em ambas as áreas. **Conclusão:** em pacientes portadoras CE e com tumores apresentando HEP a correlação entre a IHC e os achados moleculares é heterogênea e o diagnóstico entre casos com retenção ou das proteínas relacionadas a MMR não é factível apenas com realização de IHC. A análise molecular deve ser realizada em todos os casos de CE com HEP para determinar adequadamente as características intrínsecas de cada tumor. Devido à raridade desse achado,

esta proposta é financeiramente viável e tem o potencial de mudar a prática clínica em um subconjunto de pacientes, permitindo tratamentos inovadores. HEP deve ser relatado como um padrão distinto e não considerado como uma expressão sinônimo de expressão retida de proteínas MMR em CE.

ABSTRACT

Introduction: Endometrial adenocarcinoma is classified by the Bokhman system in type I and II based on clinical and epidemiological observations, whereas the type I represents low grade tumors and type II high grade tumors. Additionally, a classification based on histological aspects and molecular profile has been proposed. The TCGA (The Cancer Genome Atlas) identified four molecular groups of endometrial adenocarcinomas: (1) mutations in POLE ("ultramutated" phenotype), (2) "high copy number" (mutations in TP53), (3) "low number of copies" (in which the tumors do not exhibit any of the changes described in the other types) and (4) tumors with predominance of microsatellite instability. In a small number of patients, heterogeneous staining is observed in the evaluation protein expression for mismatch repair genes. **Objectives:** to evaluate and perform the molecular classifications of cases of endometrial carcinoma with heterogeneous staining by IHC of proteins related to mismatch repair genes and comparison of the molecular profile of positive and negative areas in the IHC study. **Cases and Methods:** From January/2007 to December/2017 354 cases with EC were identified, 16 of those with HEP. Molecular classification was made based on the PROMISE protocol for EC. Each area (retained and lost expression) was macrodissected and molecular status was evaluated separately regarding MSI status (Idylla), MLH1 promoter methylation (NGS - cutoff for positivity $\geq 15\%$), POLE status (NGS) and p53 status (IHC). Clinical and pathologic variables were also evaluated and correlated with each case. **Results:** Endometrioid histology was predominant (15 cases), as absent lymphovascular invasion (11 cases), absence of MELF pattern (10 cases), FIGO Grade 1 and 2 (13 cases), and T1 stage (13 cases). All patients were alive and disease-free at the last follow-up. Two cases that would be described as retained by IHC presented in the molecular analysis as MSI-H. In HEP cases MSH6 was more frequent (9 cases, 7 isolated). MLH1 was altered in 6 cases, and was the only protein

associated with co-alterations (with MSH6 and PMS2). Six cases were MLH1 methylated, found both in lost and retained areas. As POLE status, there were 6 mutated cases, 2 of those with mutations both in lost and retained areas, and 3 the lost area. Two cases had p53 aberrant pattern (MSH6 altered), that was seen both in the retained and in the lost areas.

Conclusion: Correlation between IHC and molecular findings is heterogeneous, and determination between retained or lost expression of MMR proteins by IHC when HEP occurs, however feasible, does not represent the actual molecular alterations. Thus, molecular analysis should be performed every case to adequately determine the intrinsic features of each tumor. Due to the rarity of this finding, this is financially viable and has the potential to change clinical practice in a subset of patients. HEP should be reported as a distinct pattern, and not considered as a synonym expression of retained expression of MMR proteins in EC.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Algoritmo das etapas da classificação molecular com o Proactive Molecular Risk Classifier for Endometrial Cancer (ProMisE) | 5 |
| Figura 2: Marcação heterogênea das proteínas de genes de reparo | 7 |
| Figura 3: Teste de amplificação de regiões alvos do gene <i>MLH1</i> | 17 |
| Figura 4: Resultados para análise metilação de regiões CpGs em <i>MLH1</i> | 18 |
| Figura 5: Perda completa de proteínas dos genes de reparo | 25 |
| Figura 6: Curva de sobrevida global livre de doença | 26 |
| Figura 7: Curva de sobrevida global em relação as variáveis moleculares | 27 |
| Figura 8: Marcação heterogênea do <i>MLH1</i> | 29 |
| Figura 9: Marcação heterogênea de <i>MSH6</i> | 30 |
| Figura 10: Marcação heterogênea de <i>MSH6</i> | 30 |
| Figura 11: Detecção da mutação somática c.857C>G; p.P286R no gene <i>POLE</i> | 33 |
| Figura 12: Fenótipo ultramutado | 36 |
| Figura 13: Fenótipo instabilidade microssatélites | 37 |
| Figura 14: Fenótipo baixo número de cópias | 37 |
| Figura 15: Fenótipo alto número de cópias | 37 |
| Figura 16: Invasão angiolímfática e padrão de infiltração tipo MELF | 38 |
| Figura 17: Algoritmo de acordo com o padrão de expressão heterogêneo das proteínas de genes de reparo | 41 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Imuno-histoquímica e especificação de cada reagente | 13 |
| Tabela 2: Concentrações padronizadas da PCR para análise de metilação no gene <i>MLH1</i> ... | 16 |
| Tabela 3: Protocolo de ciclagem da PCR para análise de metilação no gene <i>MLH1</i> | 16 |
| Tabela 4: Avaliação da interação entre variáveis em relação a presença de genes de reparo deficientes | 23 |
| Tabela 5: Avaliação da interação de variáveis em relação ao p53 padrão aberrante | 24 |
| Tabela 6: Taxas de sobrevida global em relação as variáveis clínico-patológicas | 28 |
| Tabela 7: Dados moleculares dos casos com expressão heterogênea | 30 |
| Tabela 8: Dados histológicos e clínicos dos 16 pacientes com marcação heterogênea da expressão proteínas relacionadas aos genes de reparo do DNA | 34 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------|--|
| ADJ | Adjuvância |
| BT | Braquiterapia |
| CE | Carcinoma endometriode |
| EP | Estadiamento patológico |
| G1 | Grau 1 |
| G2 | Grau 2 |
| G3 | Grau 3 |
| GB | Graziele Bovolim |
| GR | Genes de reparo |
| IHQ | Imuno-histoquímica |
| ITC | Célula tumoral isolada |
| IVL | Invasão vascular |
| IVM | Invasão miométrio |
| LDBA | Louise De Brot Andrade |
| LND | Linfonodo |
| MELF | Glândulas microcísticas alongadas fragmentadas (microcystic elongated fragmented glands) |
| MSI | Instabilidade de microsatélites |
| MSS | Estabilidade de microsatélites |
| NGS | Sequenciamento de próxima geração (Next generation sequencing) |
| QT | Quimioterapia |
| RT | Radioterapia |
| VD | Vivo sem doença |

VDes Vivo com status da doença desconhecido.

LISTA DE SIGLAS

| | |
|----------------|---|
| A | Adenina |
| C | Citosina |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| FFPE | Fixados em formalina e embebidos em parafina |
| FIGO | Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia |
| H&E | Hematoxilina & eosina |
| H2TC | Sistema de Informação Eletrônica da Instituição |
| MLH1 | Homólogo mutL 1 (mutL homolog 1) |
| MSH2 | Homólogo mutS 2 (mutS homolog 2) |
| MSH6 | Homólogo mutS 6 (mutS homolog 6) |
| p53 | Proteína 53 |
| PCR | Capacitação em tempo real |
| PD-1 | Proteína programada 1 |
| PD-L1 | Morte-ligante programada 1 |
| PMS2 | Segregação pós-meiótica 2 (postmeiotic segregation increased 2) |
| POLE | Domínio da exonuclease polimerase ϵ |
| PROMISE | Classificador Proativo de Risco Molecular para Cancer de Endométrio |
| SPSS | Pacote estatístico para as ciências sociais (Statistical Package for the Social Sciences) |
| T | Tiamina |
| TCGA | Cancer Genome Atlas |
| TMA | Tissue microarray |
| U | Uracila |
| WHO | Organização mundial da saúde (World Health Organization) |

LISTA DE SÍMBOLOS

δ Delta

ϵ Épsilon

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 9 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 10 |
| 3.1. Casuística | 10 |
| 3.2. Materiais | 11 |
| 3.3. Genes de reparo | 12 |
| 3.4. P53 | 13 |
| 3.5. POLE | 14 |
| 3.6. Metilação do promotor de MLH1 | 14 |
| 3.7. Análise de instabilidade de microssatélites | 18 |
| 4. RESULTADOS | 20 |
| 4.1. Análise de frequência | 20 |
| 4.2. Análise univariada | 22 |
| 4.3. Análise de curva de sobrevida | 26 |
| 4.4. Estatística dos casos com marcação heterogênea | 28 |
| 5. DISCUSSÃO | 35 |
| 6. CONCLUSÃO | 47 |
| 7. REFERÊNCIAS | 49 |
| 8. ANEXO | 58 |
| 9. EVENTO | 59 |

1. Introdução

O câncer de endométrio é a neoplasia maligna ginecológica mais prevalente nos países desenvolvidos e é o quarto câncer mais comum em mulheres, com cerca de 382 mil casos novos em 2020 (1). As taxas de incidência apresentaram acentuado aumento nas últimas décadas, atribuíveis, pelo menos em parte, à epidemia global de obesidade, fator de risco bem estabelecido para a doença. Nos Estados Unidos apresenta uma leve incidência aumentada em mulheres brancas em relação as mulheres negras, porém observam-se taxa de mortalidade por 100.000 pessoas de 8,8 em pacientes negras, enquanto em relação a todas as raças foi de 5.0 (2). Alterações moleculares consideradas mais agressivas foram encontradas com mais frequência em pacientes negras em relação as brancas (3).

No Brasil, a incidência foi de 6540 casos em 2020 (4). Embora a maioria das mulheres com carcinoma endometrial apresentem bom prognóstico, aquelas com doença avançada ou subtipos mais agressivos apresentam taxas mais altas de recidiva, com maior chance de complicações clínicas, morbidade, e mesmo óbito relacionado a doença.

Há muitas perguntas não respondidas nos carcinomas endometriais referentes a diagnóstico e tratamento ideais. O tratamento primordial inclui cirurgia, terapias adjuvantes, estratégias de vigilância, além de opções de preservação de fertilidade em mulheres jovens. Existem critérios de estratificação de grupos de risco com base no exame anatomopatológico, principalmente em relação ao tipo e ao grau histológico, capazes de contribuir na orientação do tratamento. Apesar dos avanços no diagnóstico e classificação, ainda é necessário aprofundar o entendimento da doença para viabilizar melhores resultados no tratamento (5).

Cerca de 75% das pacientes com câncer de endométrio são diagnosticadas nos estágios iniciais (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia [FIGO] estádios I ou II) e a sobrevida global em 5 anos é de 74-91%. Para mulheres com doença avançada (estádios

III ou IV) a sobrevida global reduz substancialmente, com resultados de sobrevida em 5 anos de 5-57% e 20-26% para os estádios III e IV, respectivamente.

Tradicionalmente os carcinomas de endométrio foram classificados como tipo I ou tipo II, conforme definido por Bokhman, com base em observações clínicas, endócrinas e epidemiológicas. Os tumores do tipo I são dependentes de estrogênio e associados à hiperplasia do endométrio. Os tumores do tipo II, por sua vez, são independentes de estrogênio e associados à atrofia do endométrio. Além das características biológicas, o carcinoma de endométrio também é classificado de acordo com características histopatológicas, com os subtipos mais comuns sendo carcinoma endometriode, carcinoma seroso, carcinosarcoma e carcinoma de células claras. Foram observadas correlações entre os subtipos nestes dois sistemas de classificação: os cânceres do tipo I geralmente possuem padrão histológico endometriode e a maioria dos cânceres tipo II são serosos e células claras. Neste sentido, habitualmente há melhor prognóstico para o tipo I em comparação com o tipo II. Esta correlação, no entanto, carece de aperfeiçoamento para o entendimento global de todas as questões prognósticas em relação à doença (6).

Existe uma tendência em selecionar as pacientes em relação ao status linfonodal, elegendo casos que podem ser submetidos a biópsia de linfonodo sentinela ou linfadenectomia expandida. Devido a taxa relativamente baixa de metástases linfonodais, torna-se questionável realização da linfadenectomia em todas as pacientes, com utilização crescente no mapeamento de linfonodo sentinela em detrimento de cirurgias mais agressivas. O objetivo primário do mapeamento é identificar os linfonodos mais expostos ao risco de metástase, a fim de limitar procedimentos complexos de linfadenectomia e suas morbidades associadas (7).

A despeito de toda tentativa de entendimento da complexidade do câncer de endométrio, torna-se cada vez mais claro que a doença compreende um grupo de tumores biologicamente, clinicamente, morfolologicamente e geneticamente heterogêneos. As classificações tradicionais não consideram inteiramente essa heterogeneidade, com limitação de seu uso como ferramenta prognóstica para avaliação de resposta à terapia. Neste sentido, a avaliação molecular e genômica têm ganhado cada vez mais espaço desde casos mais iniciais, até em pacientes com doença mais avançada (8 - 10).

A própria avaliação histológica já apresenta alguns problemas. As taxas relatadas de discordância interobservador na classificação do tipo histológico de carcinoma de endométrio variam de 10% a 20% e atingem 26% a 37% em tumores de alto grau. Possíveis explicações para tal variabilidade derivam do fato que os critérios morfológicos existentes têm detalhamento insuficiente e nem sempre estão sendo utilizados de forma completa e correta. Ademais, um terço dos tumores são morfolologicamente ambíguos e naturalmente difíceis de serem classificados (11-12).

Frente às dificuldades de classificação histológica, em 2013 foi publicada a classificação molecular do câncer de endométrio pelo *Cancer Genome Atlas* (TCGA). Estudo de coorte realizado através de 373 pacientes, obtendo amostras tumorais e DNA germinativo correspondente, acompanhadas por cerca de 32 meses. Identificaram-se quatro grupos moleculares de relacionados a características clínico-patológicas e desfecho clínico. A classificação proposta desde então forneceu uma visão mais ampla e minuciosa da biologia desta doença, trazendo mais ferramentas para avaliar melhor o prognóstico e as opções terapêuticas. A classificação descreve um novo subconjunto de tumores com mutações no domínio da exonuclease polimerase ϵ (*POLE*), um fenótipo consequentemente "ultramutado", com prognóstico mais favorável, independentemente do grau ou histologia do

tumor. Em contrapartida, os tumores classificados como "alto número de cópias" estão associados com um mau prognóstico. Os grupos de "instabilidade de microssatélites" e "baixo número de cópias" têm uma sobrevida intermediária, apresentando prognóstico compreendido entre o primeiro e o segundo grupo (8, 12-14).

Os adenocarcinomas de endométrio com alto grau histológico (grau 3) apresentam classificação molecular peculiar, com evidências de serem compostos por uma mistura de subtipos moleculares de carcinoma endometrial. Além disso, o prognóstico destes tumores baseado na classificação molecular é o mesmo em relação aos tumores de endométrio de outras graduações. A adição de marcadores moleculares identifica subgrupos prognósticos, com potenciais implicações terapêuticas (10), potencialmente mais relevante do que apenas a classificação morfológica.

Com base nas observações acima, determinar o grupo molecular em pacientes diagnosticadas com carcinoma de endométrio é clinicamente relevante, e caso não haja limitações, deveria ser realizado em todos os pacientes. Para atingir este objetivo de forma econômica, testes auxiliares usando tecido tumoral emblocado em parafina podem servir para direcionar o grupo molecular das neoplasias e separar as pacientes em grupos prognósticos adequados. Esta análise pode ser viabilizada em biópsias do endométrio ou na peça cirúrgica (15).

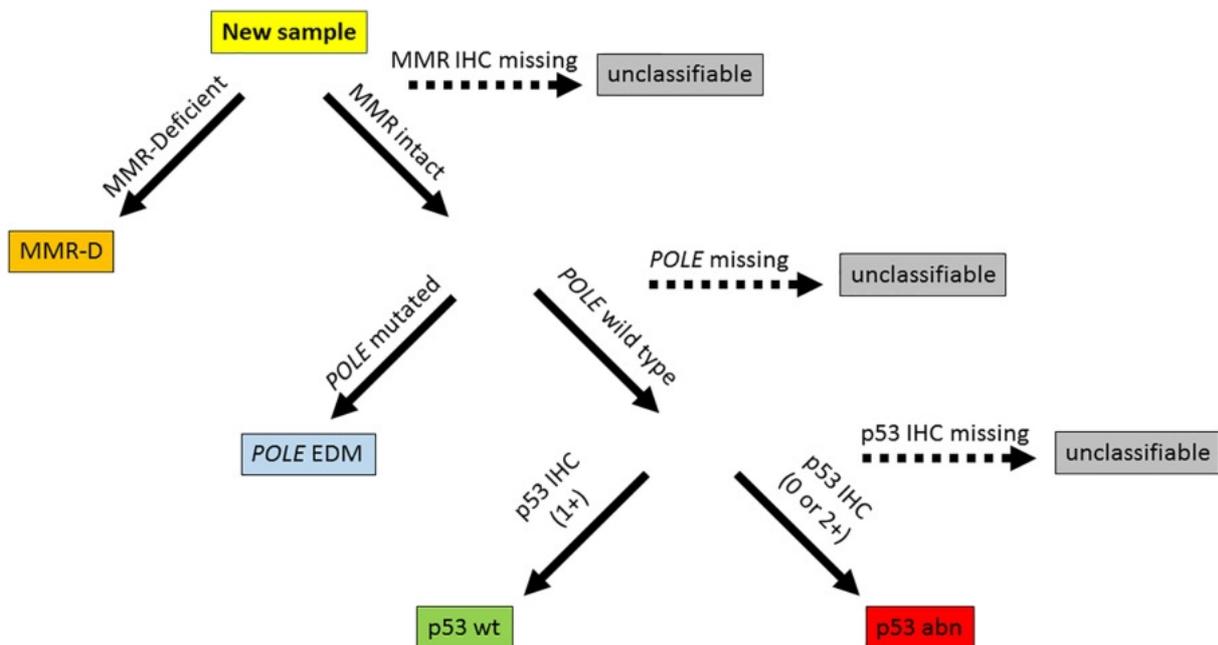
Propõe-se usar um algoritmo que contempla análise mutacional do *POLE* (exon 9-14), imuno-histoquímica para p53 e proteínas dos genes de reparo (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2). Este algoritmo não apenas é correlacionado aos resultados clínicos de forma semelhante à classificação do TCGA na análise univariada e multivariada, mas também foi capaz de melhorar a estratificação prognóstica da paciente quando combinado com fatores de risco clínico-patológicos estabelecidos. A principal vantagem de usar essa ferramenta é a

viabilidade potencial, já que os testes imuno-histoquímicos para p53 e as proteínas dos genes de reparo já estão amplamente disponíveis em laboratórios de anatomia patológica (7). A pesquisa destes anticorpos pela técnica de *tissue microarray* (TMA) é uma boa alternativa para estudos científicos com grandes coortes (16).

De acordo com o trabalho do grupo de Vancouver, os carcinomas de endométrio podem ser atribuídos a um dos quatro subgrupos do TCGA, o chamado classificador “PROMISE” (Classificador Proativo de Risco Molecular para Câncer de Endométrio) (9, 10)

Um esquema de classificação proposto é ilustrado a seguir (Figura 1.)

Figura 1 - Algoritmo das etapas da classificação molecular com o Proactive Molecular Risk



Classifier for Endometrial Cancer (ProMisE).

Legenda: A primeira avaliação é a imuno-histoquímica para proteínas dos genes de reparo, permitindo encaminhamento rápido para pesquisa de câncer hereditário e direcionar decisões cirúrgicas ou terapêuticas. Na sequência, os tumores são avaliados para mutações do domínio da exonuclease da polimerase e finalmente, o estudo imuno-histoquímico para p53.

A avaliação do gene *POLE* é realizado geralmente através de sequenciamento, considerando as porções dos éxons 9, 13 e 14 ou 9 a 14. A polimerase ϵ (pol ϵ) e polimerase δ (pol δ) são duas das principais replicases de DNA, sendo que a pol δ replica as fitas principais e posteriores, enquanto a pol ϵ se limita a síntese precisa da fita principal. Além da síntese, os domínios da exonuclease de ambas as enzimas também realizam uma revisão da fita de DNA em crescimento e correção de erros inatos ao processo de replicação (18).

Para manter a função celular normal, a estabilidade genética deve ser estritamente controlada. A fidelidade da replicação do DNA é preservada pelas ações combinadas da seletividade da base da polimerase, revisão exonucleolítica 3 a 5 e correção da incompatibilidade. Defeitos em qualquer um desses mecanismos de controle facilitarão a tumorigênese, alimentando o processo reiterativo de mutação, seleção e expansão clonal que impulsiona a progressão do câncer (18).

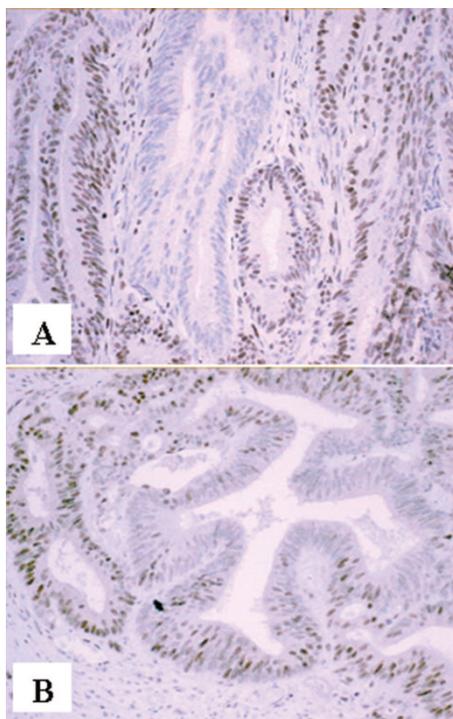
O status da expressão do sistema de reparo de incompatibilidade é geralmente avaliado por imuno-histoquímica das quatro proteínas envolvidas: MLH1, PMS2, MSH2, MSH6. Durante a replicação do DNA, microsatélites – sequências repetidas de mono ou dinucleotídeos – que são amplamente disseminadas em regiões codificantes e não codificantes do genoma, podem ser suscetíveis a erros que geralmente são corrigidos pelo complexo de reparo de incompatibilidade (19).

A expressão das proteínas de genes de reparo pode ser heterogênea trazendo grande dificuldade na interpretação e classificação molecular. Este padrão foi observado em alguns tumores de endométrio e há alguns estudos demonstrando a mesma característica em portadores de câncer colorretal, sendo possível fazer uma correlação entre os dois tumores. Em estudos mais recentes, a perda subclonal (ou heterogênea) pode ocorrer em até 7,2% dos

adenocarcinomas de endométrio (15). Em câncer colorretal, foi observada maior frequência de expressão heterogênea do MSH6, supondo uma mutação *frameshift* no trato da policitosina (instabilidade C8) (20, 21).

Dois tipos de heterogeneidade de expressão IHQ, no câncer de intestino, foram observados e descritos: áreas confluentes de perda de coloração envolvendo múltiplas glândulas adjacentes (perda zonal), e outro padrão de variação glandular com coloração das células fortemente imunorreativas misturadas com células não coradas (perda focal) (22). No nosso estudo, utilizamos a perda zonal para realizar os testes moleculares, na qual a técnica de macrodissecção é plausível.

Figura 2 – Marcação heterogênea das proteínas de genes de reparo



Legenda: A - Perda zonal; B – Perda focal. Coloração imuno-histoquímica aumento 20x

Fonte: Adaptado de Chen W, et al (2020)

Possíveis explicações para o padrão de coloração heterogêneo incluem: (1) expressão de epítipo variável; (2) mutação heterogênea de segunda ocorrência (linha germinativa ou mutações somáticas com a segunda ocorrência em parte do tumor); (3) acúmulo de metilação de MLH1 em áreas tumorais selecionadas; (4) terapia adjuvante e neoadjuvante; (5) variáveis pré-analíticas (má fixação, hipóxia tecidual) e questões técnicas dos anticorpos utilizados (20-21). Há dados sugerindo que mutações não truncadas e/ou mesmo truncadas dos genes de reparo podem resultar em atividade funcional prejudicada sem uma perda completa das proteínas, especialmente de MLH1 (23).

Em avaliação recente do grupo do Memorial Sloan Kettering Cancer Center, o pesquisador Robert Soslow cita que uma classificação que incorpora características genômicas e histopatológicas para definir subconjuntos biologicamente e clinicamente relevantes poderia facilitar o desenvolvimento de tratamentos adaptados a subgrupos específicos de doenças e potencialmente possibilitar a utilização de tratamentos de precisão a pacientes com câncer de endométrio (12).

Este projeto avaliou tumores heterogêneos através da classificação molecular proposta pelo TCGA, buscando uma melhor estratificação dos carcinomas de endométrio com expressão heterogênea dos genes de reparo do DNA, visando tratamentos com possíveis drogas alvo e melhor avaliação de prognóstico. Estudos em câncer de intestino sugerem que marcações imuno-histoquímicas heterogêneas para proteínas de genes de reparo podem apresentar alterações moleculares distintas, sendo recomendado testes moleculares para melhor avaliação e classificação tumoral, principalmente na detecção do câncer colorretal não hereditário (22).

2. Objetivos

- Realizar estudo imuno-histoquímico e classificação molecular dos casos de adenocarcinoma de endométrio com perda heterogênea da expressão das proteínas de genes de reparo do DNA.
- Comparar os achados imuno-histoquímicos e moleculares entre os componentes do carcinoma de endométrio com expressão heterogênea dos genes de reparo de DNA (área com proteínas retidas x área com proteínas perdidas).
- Descrever as características clínicas das pacientes diagnosticadas com adenocarcinoma de endométrio com expressão heterogênea dos genes de reparo, examinando também parâmetros anatomopatológicos dos tumores, perfil imuno-histoquímico, sobrevida e evolução da doença.
- Verificar a associação do perfil molecular dos adenocarcinomas de endométrio com as características clínicas dos pacientes, parâmetros anatomopatológicos das neoplasias e evolução da doença.

3. Materiais e métodos

3.1 Casuística

Foi realizado estudo de coorte retrospectivo com revisão de 640 pacientes com adenocarcinoma de endométrio submetidos a tratamento cirúrgico no A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo/SP, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2017. Foram selecionados 418 casos para realização de imuno-histoquímica, e conseguinte, a seleção de 356 pacientes com resultados completos de todos os marcadores. Foram identificados 16 pacientes com expressão heterogênea dos genes de reparo do DNA.

Critérios de inclusão:

1. Diagnóstico histológico original de adenocarcinoma de endométrio;
2. Disponibilidade de material tumoral (blocos de parafina) nos arquivos departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center;
3. Estadiamento patológico precoce ou tardio;
4. Paciente virgem de tratamento neoadjuvante.

Critérios de exclusão:

1. Histologias não epiteliais.
2. Neoplasia residual menor que 10 mm, avaliadas tanto em biópsia histeroscópica ou peça cirúrgica.
3. Reação imuno-histoquímica com resultado inconclusivo ou com artefatos pré-analíticos.

3.2 Materiais e Métodos

Os dados clínicos e anatomopatológicos foram obtidos a partir dos prontuários médicos e laudos anatomopatológicos disponíveis nos Sistemas de Informação Eletrônica da Instituição (via pesquisa no sistema Recruit/H2TC). Foram obtidos os seguintes dados: registro geral hospitalar; data do diagnóstico inicial; data da cirurgia; data da última consulta e/ou óbito; idade ao diagnóstico inicial; tratamentos adjuvantes ou neoadjuvantes (quimioterapia, radioterapia); recidivas (data e local) locorregionais e à distância; tempo de seguimento clínico; estadiamento patológico; subtipo histológico; grau histológico; invasão vascular angiolinfática e invasão miometrial tipo MELF (glândulas microcísticas, alongadas e fragmentadas).

As lâminas originais foram coradas pelo método de hematoxilina & eosina (H&E). Os casos selecionados foram reavaliados e revisados por duas patologistas especialistas em ginecopatologia (LDBA) (GB). A classificação histológica foi baseada nas recomendações da Classificação de Tumores Ginecológicos da WHO (World Health Organization) (2020) (6).

Após a revisão e classificação morfológica foi realizada a pesquisa das proteínas de genes de reparo do DNA por meio de estudo imuno-histoquímico em lâmina de um corte bem representativo do tumor. Em seguida, buscou-se identificar marcação heterogênea dessas proteínas, utilizando-se peças cirúrgicas ou, em casos que a peça não estava disponível, na biópsia histeroscópica. As lâminas foram macrodissecadas para separação das áreas com perda ou retenção das proteínas dos genes de reparos do DNA e a amostra de cada uma dessas áreas seguiu para a classificação molecular através de pesquisa de instabilidade de microssatélites (MSI) pela técnica Idylla™, sequenciamento de *POLE* e pesquisa de metilação do promotor de *MLH1* por *Next Generation Sequencing* (NGS).

Os resultados foram apresentados em termos de frequência em tabelas e gráficos. Variáveis contínuas foram apresentadas como medianas e variáveis categóricas apresentadas como frequência absoluta e porcentagens. A análise estatística, quando necessária, foi realizada por meio do programa SPSS 23.0 para Windows. Para análise de variáveis categóricas e proporções entre grupos foram utilizados o teste qui-quadrado e os testes de Mann Whitney e teste T de Student quando aplicável. As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier com utilização do teste logrank para cálculo.

3.3 Genes de reparo

Reações de imuno-histoquímicas foram realizadas mediante os seguintes marcadores: MSH2 (G219-1129-Cell Marque/Ventana), MSH6 (SP93 –Ventana), MLH1 (M1 – Ventana) e PMS2 (A16-4 – Ventana).

As reações foram realizadas no sistema automatizado Ventana BenchMark XT (Ventana Medical Systems) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, as lâminas foram desparafinizadas utilizando a solução EZprep (cat. 950-102, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA). A recuperação antigênica foi feita com os reagentes cell conditioning 1 (cat. 950-224, Ventana Medical Systems, Inc.) ou cell conditioning 2 (cat. 950-223, Ventana Medical Systems, Inc.) a 95°C. A especificação do kit de detecção, recuperação e diluição de cada anticorpo está descrito na tabela 1. Após o ensaio de imuno-histoquímica, as lâminas foram montadas com meio de montagem Entellan (cat. 107961, Merck) e entregues para avaliação histopatológica.

Tabela 1 - Imuno-histoquímica e especificação de cada reagente

| Anticorpo | Catálogo | Empresa | Diluição | Protocolo | Kit de detecção | Controle |
|-----------|----------|---------|--------------------|-------------------|-----------------|------------|
| anti-P53 | 800-2912 | ROCHE | AB pronto para uso | 60 min CC1 + 32AB | Ultraview | Ovário |
| anti-MLH1 | 760-5091 | ROCHE | AB pronto para uso | 80 min CC1 + 32AB | Optiview | Endométrio |
| anti-MSH2 | 760-5093 | ROCHE | AB pronto para uso | 80 min CC1 + 44AB | Optiview | Endométrio |
| anti-MSH6 | 760-5092 | ROCHE | AB pronto para uso | 80 min CC1 + 40AB | Optiview | Endométrio |
| anti-PMS2 | 760-5094 | ROCHE | AB pronto para uso | 92 min CC1 + 32AB | Optiview | Endométrio |

As reações sempre estavam acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum e os resultados classificados em relação à positividade, negatividade e heterogeneidade.

3.4 P53

A pesquisa do antígeno p53 (DO-7-Ventana) foi realizada mediante o dispositivo técnico chamado de “Tissue Microarray” (TMA) (Beecher Instruments, Silver Springs, EUA). Para construção do TMA o patologista selecionou nas lâminas de rotina as áreas do tumor a serem amostradas nos blocos de parafina, dos quais foram confeccionados 4 blocos originais da casuística de 418 casos. Foram obtidos dois cilindros de 0,6 mm da área tumoral posteriormente montados em um novo bloco de parafina com posição bidimensional separada por espaço de 0,2 mm, determinada e gravada pelo equipamento. A partir deste novo bloco foram preparados cortes histológicos em 4 lâminas de diferentes níveis do TMA, separados por pelo menos 125µm de distância entre dois cortes e garantindo amostras

celulares diferentes para cada tumor. Essas lâminas foram avaliadas por imuno-histoquímica, conforme descrição prévia da técnica. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum e os resultados classificados em relação a positividade focal ou difusa, ou ainda, negatividade. Nos casos que forem negativos para p53 foi realizada reação em uma lâmina inteira do tumor para confirmar o padrão de marcação da proteína.

3.5 POLE

A pesquisa de mutação do gene *POLE* foi realizada por sequenciamento de amplicons através de NGS (*next generation sequencing*). Para isto, foram utilizados 3 pares de *primers* capazes de amplificar as regiões de interesse do gene *POLE* (éxons 9 a 14, códons 286, 297, 411, 456 e 459). O DNA das amostras tumorais foi submetido a reações de PCR multiplex utilizando a enzima QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, seguindo o protocolo do fabricante. Os produtos das reações de PCR foram avaliados em gel de agarose, e o volume restante foi utilizado para construção das bibliotecas de *amplicon* com o kit *Ion Plus Fragment Library* (*Thermo Fisher*), de acordo com as instruções do fabricante. As etapas de PCR em emulsão (ePCR) e sequenciamento foram realizadas com os kits Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 Kit, Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit e Ion PI™ Chip Kit v3, seguindo as instruções do fabricante. Os dados gerados pelo sequenciador Ion Proton foram analisados com as ferramentas Torrent Suite e Variant Caller. Os critérios para a chamada de variantes foram de cobertura mínima de 500 vezes e frequência da variante de pelo menos 2%.

3.6 Metilação do promotor *MLH1*

A análise de metilação do promotor do gene *MLH1* foi realizada por sequenciamento de nova geração após conversão do DNA tumoral por bissulfito de sódio. Esta técnica envolve

o tratamento de DNA com bissulfito de sódio, que converte citosinas (C) não metiladas em uracilas (U). As C metiladas permanecem inalteradas após o tratamento. Uma vez convertido, o perfil de metilação do DNA pode ser determinado através de PCR seguida por alguma metodologia de sequenciamento de DNA quantitativa. Durante a reação de PCR a uracila é substituída pela timina. O DNA convertido pode então ser analisado por sequenciamento, sendo que a conversão de C para T significa citosina não-metilada enquanto C que permanece C significa citosina metilada. Neste estudo, utilizamos como metodologia o NGS na plataforma Ion Proton (Thermo Scientific).

Para isto, inicialmente delimita-se a região do promotor de *MLH1* a ser analisada entre as posições -209 a -181 do local de início da transcrição do gene, região de 264 pares de bases que apresenta 5 dinucleotídeos CpGs e é avaliada em kits comerciais validados para avaliação de metilação neste gene (kit PyroMark Q24 CpG *MLH1* – Qiagen). Primers específicos para amplificar esta região foram desenhados, considerando a sequência convertida da região (*MLH1_met_F*: AGGTTATAAGAGTAGGGTT; *MLH1_met_R2*: AACCYAACTTATATACCTCTACT).

Para a reação de conversão por bissulfito de sódio, 20ul de DNA do tumor (tecido congelado a fresco ou FFPE) (sendo a concentração final de aproximadamente 50 ng totais) foi tratado com o kit EZ DNA Methylation-Gold (ZYMO RESEARCH), seguindo o protocolo do fabricante. O DNA convertido foi submetido à reação de PCR conforme o protocolo das tabelas 2 e 3. Os produtos das reações de PCR foram avaliados em gel de agarose. Um exemplo do padrão de amplificação obtido é mostrado na Figura 3.

Tabela 2 - Concentrações padronizadas da PCR para análise de metilação no gene *MLH1*.

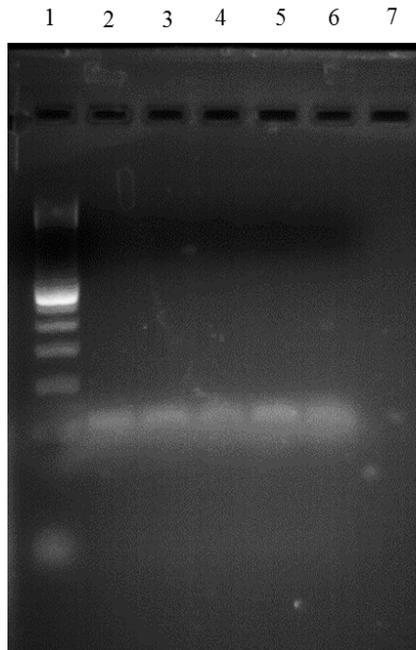
| Protocolo Platinum - PCR | Volume |
|--------------------------|----------|
| H2O | 20,55 ul |
| Buffer TAQ HF 10x | 3ul |
| MgSO4 50mM | 1,2 ul |
| dNTP 10mM | 0,6 ul |
| Primer Forward 10 mM | 0,5 ul |
| Primer Reverse 10 mM | 0,5 ul |
| Taq High-fidelity 1U/uL | 0,15 ul |
| DNA convertido 10ng/ul | 3,5 ul |
| Volume final | 30 ul |

Tabela 3 -Protocolo de ciclagem da PCR para análise de metilação no gene *MLH1*.

| Temperatura | Tempo | Ciclos |
|------------------------------|-------|--------|
| 94°C | 2m | 1x |
| 94°C | 30s | 1x |
| 50°C ↓ 0,2°C a cada ciclo | 30s | 40x |
| 68°C | 1m | 1x |
| 68°C | 10m | 1x |
| 4°C ∞ | | |

Legenda: m - Minutos; s - Segundos; x - Quantidade de ciclos.

Figura 3 - Teste de amplificação de regiões alvos do gene *MLH1*.



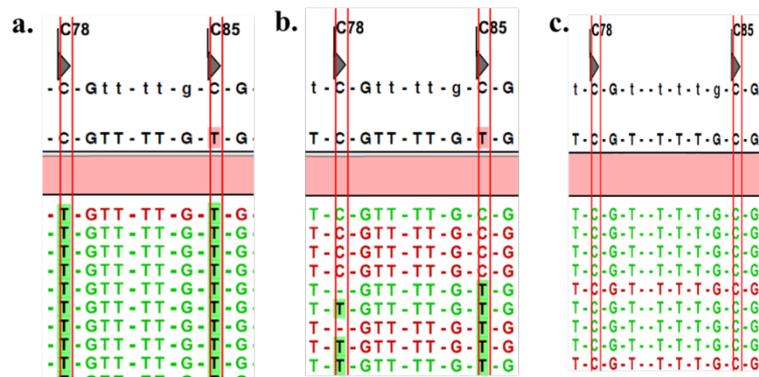
Legenda: Amplificação de regiões alvos do gene *MLH1* em diferentes tipos de amostras. (1). *Ladder* (Marcador de peso molecular); (2,3,4). Amostras de DNA de parafina; (5). Amostra de DNA de saliva; (6). DNA controle positivo (Metilado); (7) Controle negativo.

Após a confirmação de amplificação por análise em gel de agarose, o volume restante da reação de PCR (25uL) foi utilizado para construção das bibliotecas de amplicon com o kit Ion Plus Fragment Library (ThermoFisher), de acordo com as instruções do fabricante. Para o sequenciamento, a etapa de PCR em emulsão (ePCR) foram realizadas com o Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 Kit. Por fim, o sequenciamento foi realizado utilizando o Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit, juntamente com o Ion PI™ Chip Kit v3.

Após o sequenciamento, foi utilizado o software CLC para a análise da metilação nos dinucleotídeos CpG (Figura 4). As sequências geradas foram mapeadas na referência convertida da região utilizando o software CLC Genomics Workbench. As frequências das bases C e T de quatro citosinas CpGs e de três citosinas controles (não CpGs) foram anotadas e foi considerada a média entre os quatro CpGs de menor desvio. A conversão por bissulfito

de sódio foi considerada eficiente quando a média da frequência de bases C na região das três citosinas controles é <2%. As amostras foram consideradas positivas para metilação de *MLH1* quando a média da frequência de bases C na região das 4 citosinas CpGs foi >15%.

Figura 4 - Exemplos de resultados para análise metilação de regiões CpGs em *MLH1*.



Legenda: A - Regiões de CpGs não metilados; B - Regiões de CpGs parcialmente metiladas; C - Regiões de CpGs totalmente metilados. Fonte: Software CLC Genomics WorkBench 6.

3.7 Análise de Instabilidade de Microsatélite

A avaliação de instabilidade de microsatélites (MSI) foi realizada em amostras tumorais em FFPE através do ensaio Idylla™ MSI. Este teste realiza uma análise qualitativa pela detecção de um painel de sete biomarcadores microsatélites monomórficos para determinação de MSI (ACVR2A, BTBD7, DIDO1, MRE11, RTR3, SEC31A e SULF2). O ensaio foi realizado de forma automatizada de acordo com o protocolo do fabricante, a partir do raspado de oito cortes das amostras de tumor FFPE de cada área positiva e negativa, sem a necessidade de extração de DNA prévia. O raspado do tecido tumoral foi adicionado diretamente no cartucho do teste e, depois de inserido no equipamento, as etapas de liberação do DNA, amplificação por PCR e detecção dos alelos por *high resolution*

melting ocorreram todas automaticamente dentro do cartucho. Os resultados do ensaio são classificados em: amostras estáveis ou MSS (>6 marcadores apresentam estabilidade); amostras com instabilidade ou MSI-high (>2 marcadores apresentam instabilidade).

4. Resultados

Foram revisados 640 casos de adenocarcinoma de endométrio, com consequente seleção de 418 amostras para realização de estudo imuno-histoquímico. Destes, foram selecionadas 356 pacientes para revisão do presente estudo. Os dados foram retirados dos laudos pré-existentes, e foram revisados para classificação histológica, confirmação da marcação dos genes de reparo e análise de p53.

4.1 Análise de frequência

Na análise de frequência, a média de idade foi 61,4 anos (mínimo: 28; máximo 92). A histologia endometriode foi predominante (278 casos – 78,1%), seguidos por carcinomas serosos (40 casos – 11,2%) e de células claras (8 casos – 2,2%). Houve, ainda, classificação em carcinomas mistos (14 casos – 3,9%), sendo mais frequente a associação entre histologia endometriode e serosa (8 casos – 2,2%), seguido de endometriode e células claras (6 casos – 1,7%). Por fim, ainda houve 16 casos (4,4%) desdiferenciados/indiferenciados. Em relação ao tipo de metaplasia (147 casos) encontrada nos tumores endometrioides, 88 (24,7%) apresentavam diferenciação escamosa, 35 (9,8%) mucinosa e 24 (6,7%) escamosa e mucinosa concomitante.

O grau histológico foi avaliado através do grau da FIGO em I, II e III, sendo que no grau III, foram incluídos os carcinomas endometrioides grau III, seroso, células claras e desdiferenciados/indiferenciados (para fins estatísticos). A frequência dos tumores de baixo grau (I e II) foi de 252 casos (70,8%) e alto grau (III) foi de 104 casos (29,2%).

A maioria dos casos (252 – 70,8%) apresentava neoplasia restrita ao endométrio ou invasão miometrial menor que 50%, enquanto infiltração maior que 50% corresponderam a 94 casos (26,4%) e infiltração da serosa a 10 casos (2,8%).

Invasão angiolinfática (IVL) foi encontrada em 128 casos (36%) e invasão tipo MELF (*microcystic elongated fragmented glands*) em 68 (19,1%) casos avaliados em histologia endometrióide. O acometimento de anexos uterinos, um evento pouco frequente, estava presente em 35 pacientes (9,8%).

A avaliação de linfonodos foi realizada através da pesquisa de linfonodo sentinela e/ou linfadenectomia. Linfadenectomia exclusiva foi o evento mais frequente, realizada em 198 pacientes (55,6%), linfadenectomia associado a pesquisa de linfonodo sentinela em 67 pacientes (18,8%), linfonodo sentinela exclusivo em 37 casos (10,4%). Cinquenta e quatro (15,2%) pacientes não realizaram pesquisa de linfonodos. Foi encontrado um total de 63 (17,7%) pacientes com linfonodos positivos. Dentre as pacientes com linfonodos sentinelas avaliados, 17 (4,8%) se apresentavam positivas, sendo que a maioria apresentava micrometástase (8 – 2,2%), seguido por 5 (1,4%) casos com células tumorais isoladas (ITC) e 4 (1,1%) casos com macrometástase. A maioria das metástases (11 – 3,1%) foi diagnosticada por imuno-histoquímica (AE1/AE3 – clone (AE1/AE3/PCK26-Ventana).

O estadiamento patológico foi avaliado pelos critérios da Federação Internacional de Gineco-Oncologia. O estágio IA foi o mais frequente, com 162 pacientes (45,5%). Em relação ao tratamento adjuvante, 215 pacientes (60,4%) receberam algum tipo de tratamento adicional, como braquiterapia, radioterapia externa ou quimioterapia, exclusivas ou concomitantes, sendo mais frequente braquiterapia (181 – 50,8%), seguida de radioterapia externa (133 – 37,4%) e quimioterapia (104 – 29,2%).

A situação vigente mais comum foi de pacientes vivos sem evidência de doença (283 - 79,5%), seguido por vivo com evidência de doença (18 casos – 5,1%) e uma (0,3%) paciente viva com status desconhecido da doença. Óbito pela doença ocorreu em 38 pacientes (10,7%) e óbito por outras causas sem evidência de doença, em 16 pacientes (4,5%). A maioria das

pacientes não sofreu recaída da doença, embora um número considerável de pacientes ainda tenha apresentado recidiva (66 paciente -18,5%).

4.2 Análise univariada

Foi realizada análise univariada por meio de teste de hipóteses (qui-quadrado) para avaliação da relação entre algumas variáveis. Com relação a invasão angiolinfática (IVL) e deficiência das proteínas dos genes de reparo do DNA houve significância estatística para a interação (valor $p = 0,004$). Demonstrou-se que 48% dos casos com deficiência de expressão apresentam IVL (48/128), enquanto 31,6% dos casos com genes de reparo proficiente, apresentam IVL (80/128).

A mesma relação foi feita com o padrão de infiltração MELF, um valor $p=0,02$. Observou-se que 28,3% das pacientes com perda de genes de reparo tinham MELF (28/67), ao passo que a presença de MELF com genes de reparo mantido foi de 15,4% (39/67).

Em relação às demais variáveis testadas (comprometimento de anexos uterinos, grau da FIGO, profundidade de infiltração do miométrio e comprometimento de linfonodos pélvicos), também foi realizado o teste de hipóteses, em relação a perda da expressão das proteínas de genes de reparo, porém não houve significância estatística para as interações. Estes resultados podem ser encontrados na tabela 4.

Tabela 4 - Avaliação da interação entre variáveis em relação a presença de genes de reparo deficientes.

| Variável | Categoria | N (%) | Valor p |
|----------------------|---------------|------------|--------------|
| IVL | Presente | 48 (48%) | 0,003 |
| | Não detectada | 52 (52%) | |
| MELF | Presente | 29 (33%) | 0,005 |
| | Ausente | 59 (67%) | |
| Linfonodo positivo | Presente | 23 (27,1%) | 0,101 |
| | Ausente | 62 (72,9%) | |
| Anexos comprometidos | Presente | 92 (92%) | 0,468 |
| | Ausente | 8 (8%) | |
| Grau FIGO | G1/G2 | 64 (64%) | 0,078 |
| | G3 | 36 (36%) | |
| Invasão do miométrio | <50% | 67 (67%) | 0,326 |
| | ≥50% | 33 (33%) | |

Legenda: IVL (invasão angiolímfática; MELF (microcystic elongated fragmented glands), G (grau).

Também foi realizada análise univariada por meio de teste de hipóteses (qui-quadrado) com relação ao padrão de expressão aberrante de marcação com p53, havendo significância estatística na correlação com grau da FIGO, profundidade de invasão do miométrio, presença de invasão vascular e comprometimento de anexos uterinos. Não houve significância estatística na interação com o comprometimento de linfonodos. Os dados detalhados são mostrados na tabela 5.

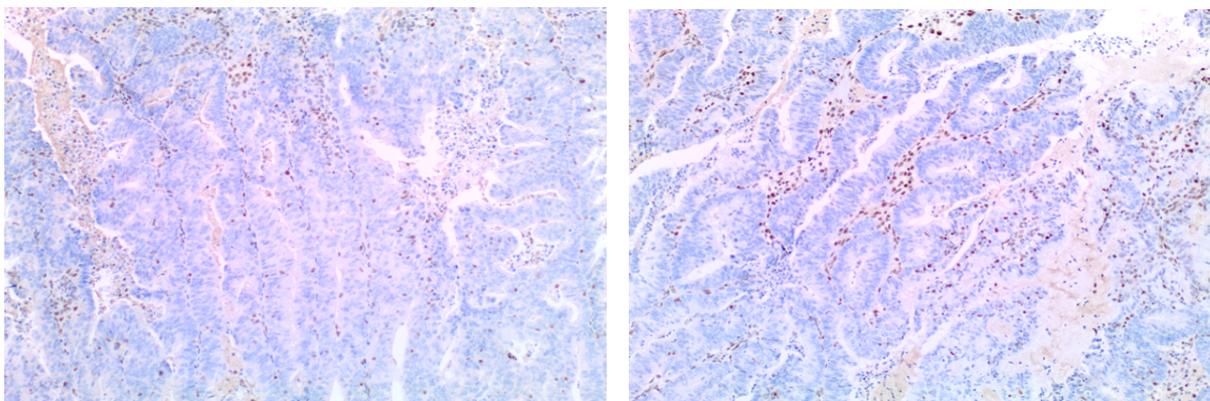
Tabela 5 - Avaliação da interação de variáveis em relação ao p53 padrão aberrante.

| Variável | Categoria | N (%) | Valor p |
|-----------------------------|---------------|------------|-------------------|
| Grau FIGO | G1/G2 | 12 (24,5%) | <0,0001 |
| | G3 | 37 (75,5%) | |
| Invasão do miométrio | <50% | 28 (57,1%) | 0,024 |
| | ≥50% | 21 (42,9%) | |
| IVL | Positivo | 26 (53,1%) | 0,007 |
| | Não detectada | 23 (46,9%) | |
| Anexos comprometidos | Presente | 14 (28,6%) | <0,0001 |
| | Ausente | 35 (71,4%) | |
| Linfonodos positivos | Presente | 10 (23,8%) | 0,621 |
| | Ausente | 32 (76,2%) | |

Legenda: IVL (invasão angiolinfática), G (grau).

A perda completa da expressão das proteínas dos genes de reparo do DNA em pelo menos um dos marcadores ocorreu em 100 casos (28,1%). A alteração mais frequentemente encontrada foi a perda de expressão da dupla PMS2 e MLH1 (62 casos – 17,4%), seguindo pela dupla MSH2 e MSH6 (28 casos – 7,9%). Perda isolada de uma das proteínas ocorreu em 14 casos (4%) para MSH6 e 8 casos (2,3%) para PMS2 (Figura 5).

Figura 5 - Perda completa de proteínas dos genes de reparo



Legenda: Ausência de marcação nas proteínas dos genes PMS2 (à esquerda) e MLH1 (à direita), controle interno positivo nos linfócitos. Coloração imuno-histoquímica aumento 20x

Em relação à expressão do p53, o padrão aberrante estava presente em 49 casos (13,8%). Trinta e nove (11%) deles apresentavam expressão forte e difusa e 10 (2,8%) padrão *null* (totalmente negativo). Em contrapartida, o padrão não aberrante, com expressão fraca e focal dos núcleos, foi observado em 307 pacientes (86,2%). Sete pacientes apresentaram de forma concomitante perda das proteínas dos genes de reparo e p53 padrão aberrante, mais comumente a perda de MSH6 (4 casos) e a histologia predominante endometrióide.

As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier com utilização do teste logrank para cálculo, com avaliação de sobrevida em 5 anos (60 meses) como padrão. A análise de sobrevida livre de doença em 5 anos foi de 85,9% (Figura 6). A curva de sobrevida global relacionada a expressão de genes de reparo deficiente foi de 85,8% (Figura 7). Outro dado relevante foi a curva de sobrevida global associada a expressão aberrante do p53, com índice de 70,5%, um pouco menor quando comparada a perda da expressão dos genes de reparo (Figura 7). Notou-se que em relação aos dados descritos no TCGA sobre avaliação do prognóstico segundo cada fenótipo molecular, a curva de sobrevida relacionada aos marcadores moleculares apresentou semelhança com o fenótipo alto número de cópias e

instabilidade de microssatélites, com sobrevida menor e intermediária, respectivamente. A curva de sobrevida de pacientes sem perda de genes de reparo (fenótipos ultramutado e baixo número de cópias) não foi avaliada separadamente na nossa casuística.

4.3 Análise de curvas de sobrevida

Figura 6 - Curva de sobrevida global.

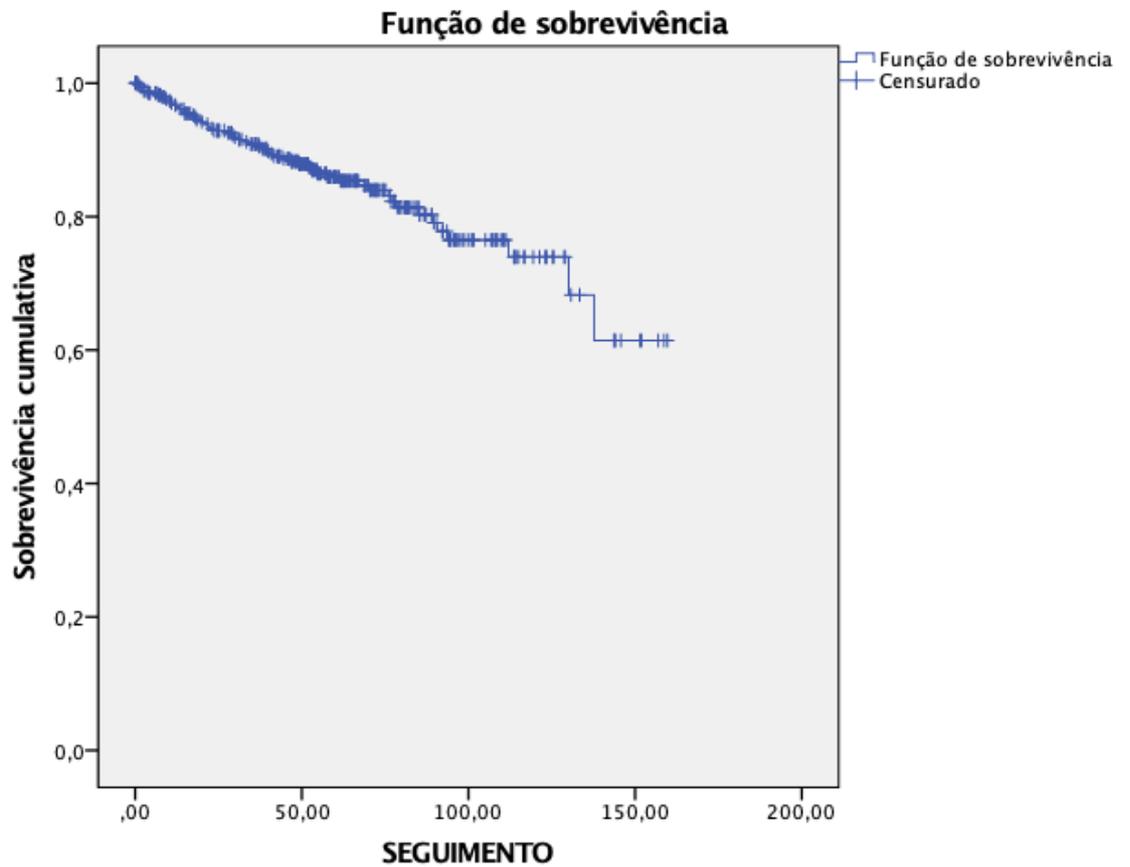
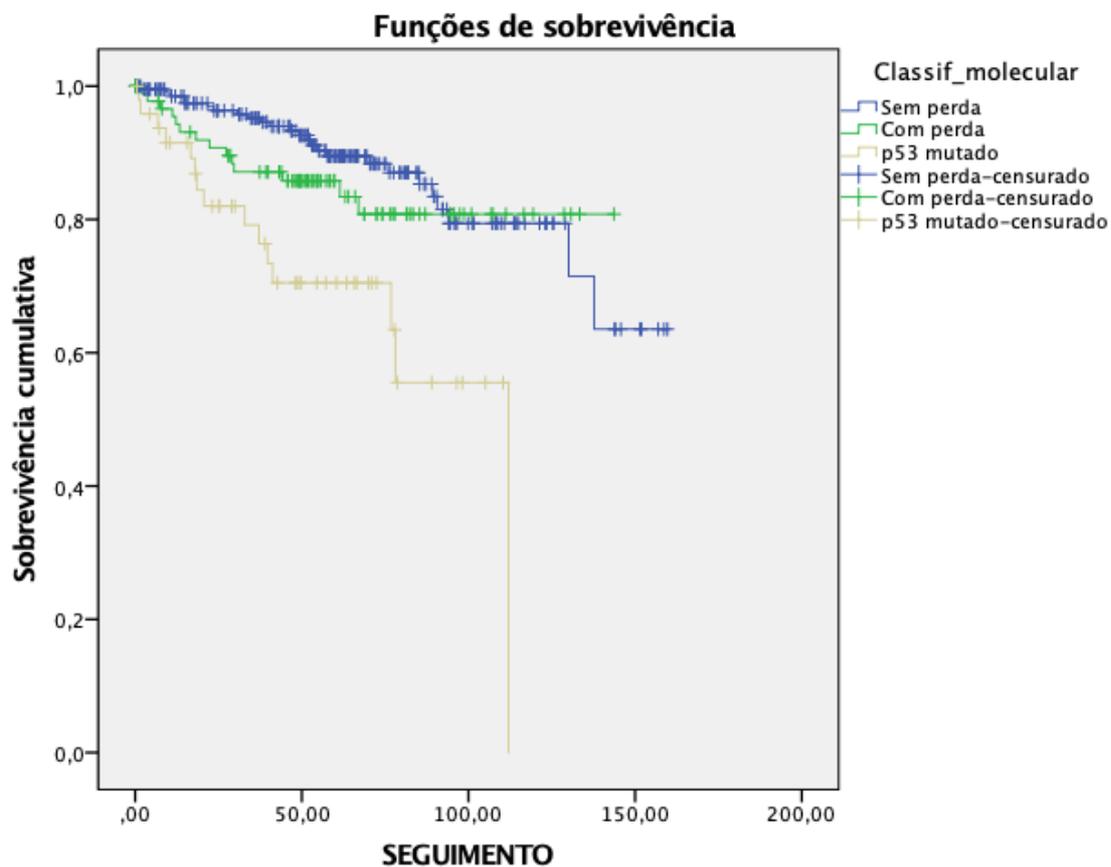


Figura 7 - Curva de sobrevida global em relação as variáveis moleculares.



Ainda, sobre as análises de curvas de sobrevida global associada as variáveis clínico-patológicas, observamos redução de sobrevida com valor de p apresentando significância estatística nas associações com grau da FIGO, invasão miométrio, invasão angiolinfática, comprometimento de anexos e linfonodos positivos (Tabela 6).

Tabela 6 - Taxas de sobrevida global em relação as variáveis clínico-patológicas.

| Variável | Status | Sobrevida 5 anos | Valor p |
|-----------------------------|----------------|------------------|-------------------|
| Grau FIGO | G1/G2 | 91,8% | <0,0001 |
| | G3 | 72,5% | |
| Invasão do miométrio | <50% | 92,9% | <0,0001 |
| | >50% | 70,8% | |
| | Invasão serosa | 50% | |
| IVL | Ausente | 92,4% | <0,0001 |
| | Presente | 74,9% | |
| Anexos comprometidos | Ausente | 89,8% | <0,0001 |
| | Presente | 50,7% | |
| Linfonodos positivos | Ausente | 94,3% | <0,0001 |
| | Presente | 64,4% | |
| MELF | Ausente | 89,8% | 0,66 |
| | Presente | 92,3% | |

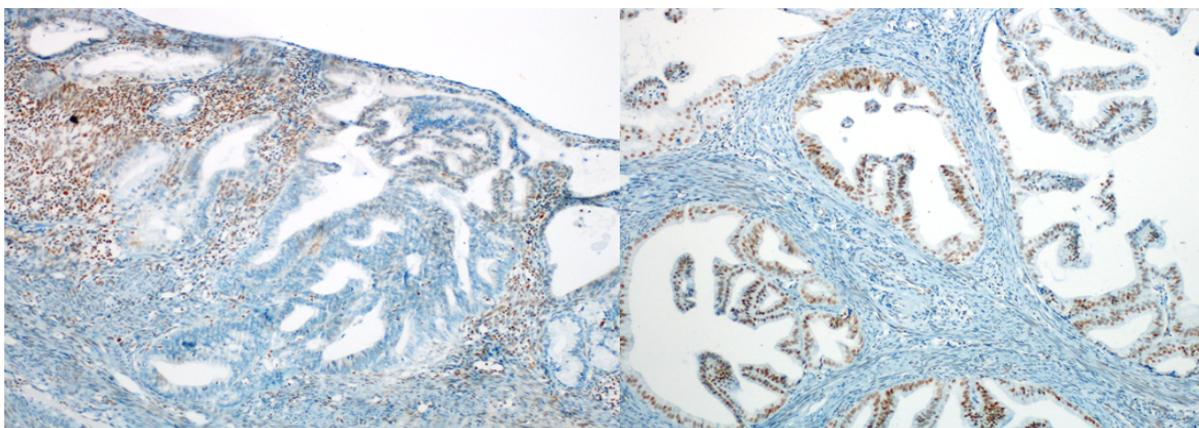
Legenda: IVL (invasão angiolinfática; MELF (microcystic elongated fragmented glands), G (grau)

4.4 Estatística dos casos com marcação heterogênea

Nos casos revisados, foram encontradas 16 (4,4%) pacientes com marcação imunohistoquímica de padrão heterogêneo para as proteínas dos genes de reparo do DNA. Estes casos foram submetidos a análise molecular das duas áreas (proficiente e deficiente para genes de reparo). A porcentagem tumoral de cada área macrodissecada variou de 60-90%. Dentre todos os casos selecionados para avaliação molecular, 15 apresentavam expressão preservada em todos os genes de reparo, com marcação subclonal (heterogênea) em algum dos genes. O caso 15, teve deficiência completa dos marcadores PMS2 e MLH1, além da perda

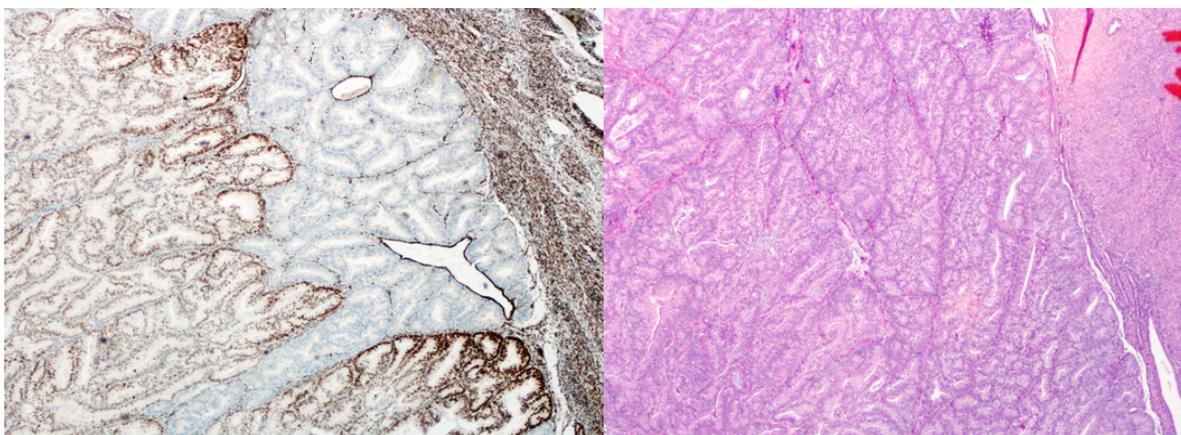
subclonal do MSH6. A perda subclonal mais frequentemente observada foi do MSH6 (9 casos – 56,25%), sendo 6 casos de forma isolada, além do caso 13 que foi associado a marcação heterogênea do MLH1 e o caso 15, associado a perda completa da dupla PMS2 e MLH1 (Figura 8, 9 e 10). A tabela 7 detalha os dados moleculares de cada caso.

Figura 8 - Marcação heterogênea do MLH1

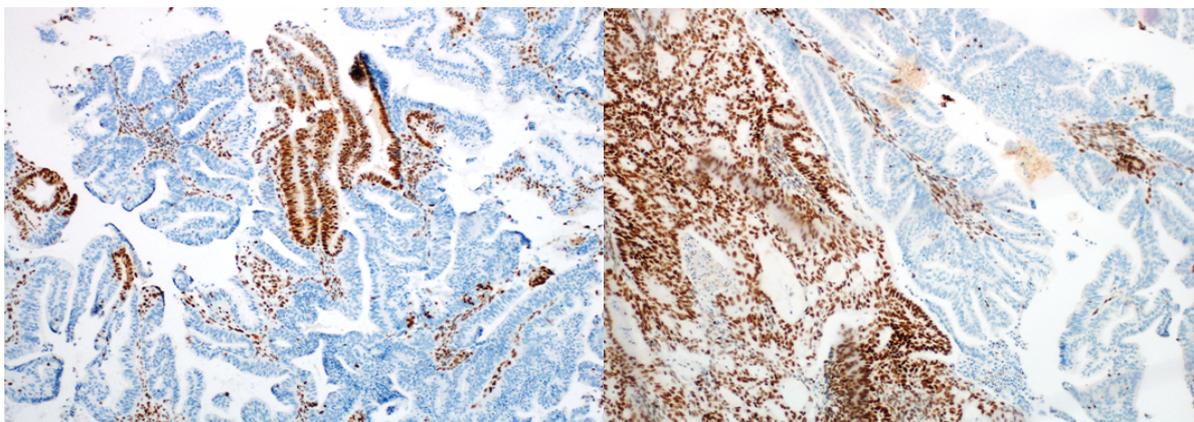


Caso 12: Área rica em linfócitos peritumorais e perda da expressão da proteína MLH1. Fenótipo baixo número de cópias. Coloração imuno-histoquímica aumento 20x .

Figura 9 - Marcação heterogênea de MSH6



Caso 14: Paciente com histologia endometriode, e metilação de *MLH1* na região negativa. Coloração imuno-histoquímica e HE aumento 20x.

Figura 10 - Marcação heterogênea de MSH6.

Caso 15: Instabilidade de microssatélites e metilação do promotor *MLH1*. Coloração imuno-histoquímica aumento 20x.

Tabela 7 – Dados moleculares dos casos com expressão heterogênea.

| Caso | GR subclonal | Expressão IHQ (área) | Idylla | Metilação MLH1 | <i>POLE</i> | p53 |
|----------|--------------|----------------------|--------|----------------|---------------------|----------|
| 1 | MSH2 | Positiva | MSI | Metilado 44,8% | Selvagem | Selvagem |
| | | Negativa | MSI | Metilado 31,5% | Selvagem | Selvagem |
| 2 | PMS2 | Positiva | MSS | Metilado 31,3% | Selvagem | Selvagem |
| | | Negativa | MSS | Metilado 39,7% | Selvagem | Selvagem |
| 3 | MLH1 | Positiva | MSS | Não metilado | C857C>G;p.P286R 27% | Selvagem |
| | | Negativa | MSS | Não metilado | C857C>G;p.P286R 25% | Selvagem |
| 4 | MSH6 | Positiva | MSS | Não metilado | Selvagem | Positivo |
| | | Negativa | MSS | Não metilado | Selvagem | Positivo |
| 5 | MSH6 | Positiva | MSS | Não metilado | Selvagem | Selvagem |
| | | Negativa | MSS | Não metilado | Selvagem | Selvagem |
| 6 | MSH6 | Positiva | MSS | Não metilado | Selvagem | Selvagem |
| | | Negativa | MSS | Não metilado | Selvagem | Selvagem |

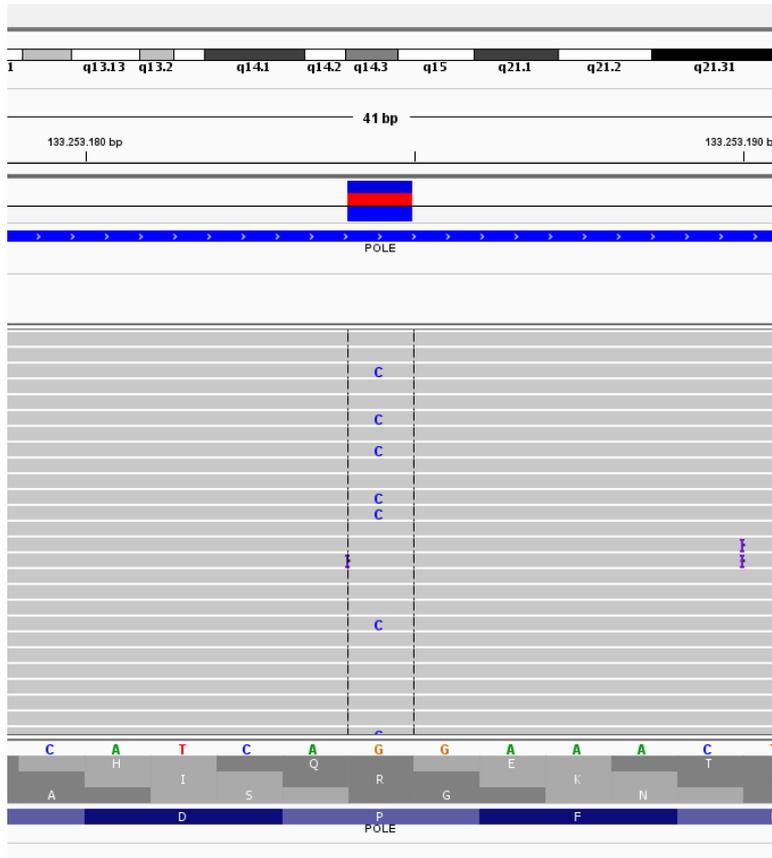
| | | | | | | |
|-----------|--------------------------------------|----------|--------|-------------------|------------------------|----------|
| 7 | MSH6 | Positiva | MSS | Não metilado | Selvagem | Selvagem |
| | | Negativa | MSS | Não metilado | Selvagem | Selvagem |
| 8 | MSH6 | Positiva | MSS | Não metilado | Selvagem | Selvagem |
| | | Negativa | MSS | Não metilado | Selvagem | Selvagem |
| 9 | PMS2 MLH1 | Positiva | MSS | Metilado 88,8% | c857C>G;p.P286R 39% | Selvagem |
| | | Negativa | MSS | Metilado 88,1% | c857C>G;p.P286R 36% | Selvagem |
| 10 | MLH1 | Positiva | MSS | Não metilado | Selvagem | Selvagem |
| | | Negativa | MSS | Não metilado | Selvagem | Selvagem |
| 11 | MSH6 | Positiva | MSS | Não metilado | Selvagem | Selvagem |
| | | Negativa | MSS | Não metilado | Selvagem | Selvagem |
| 12 | MLH1 | Positiva | MSS | Não metilado | Selvagem | Selvagem |
| | | Negativa | MSS | Não metilado | Selvagem | Selvagem |
| 13 | MSH6 MLH1 | Positiva | MSS | Não metilado | Selvagem | Selvagem |
| | | Negativa | MSS | Não metilado | Selvagem | Selvagem |
| 14 | MSH6 | Positiva | Falhou | Não metilado | Selvagem | Positivo |
| | | Negativa | Falhou | Metilado 34,8% | Selvagem | Positivo |
| 15 | MSH6 (PMS2 MLH1 deficiente) | Positiva | MSI | Metilado 28,8% | Selvagem | Selvagem |
| | | Negativa | MSI | Metilado 62,9% | Selvagem | Selvagem |
| 16 | PMS2 | Positiva | MSS | Metilado 16,9% | c.1231G>T 8% V411L | Selvagem |
| | | Negativa | MSS | Falhou | c.1231G>T 22% V411L | Selvagem |

Legenda: GR (genes de reparo); MSS (Estabilidade microsatélites), MSI (instabilidade microsatélites)

Dois dos 16 casos estudados apresentaram instabilidade de microssatélites em ambas as áreas (proficiente e deficiente), com 5 biomarcadores com mutação no caso 1 (BTBD7, DIDO1, MRE11, SEC31A E SULF2), além de metilação em *MLH1*. No caso 15, que apresentou instabilidade de microssatélites, havia alteração nos 7 biomarcadores (ACVR2A, BTBD7, DIDO1, MRE11, RTR3, SEC31A e SULF2), e presença de metilação em *MLH1*. O caso 14 apresentou falha na reação Idylla em ambas as áreas.

A metilação do promotor de *MLH1* estava presente em 6 casos, sendo que 4 pacientes apresentavam a metilação em ambas as áreas. Ocorreu falha na reação de metilação no caso 16. A mutação do gene *POLE* foi encontrada em 3 casos, avaliando-se individualmente as áreas proficientes e deficientes para genes de reparo, sendo que em todos os casos, a mutação estava presente em ambas as áreas. Ainda, houve concomitância de mutação em *POLE* e metilação em *MLH1* nos casos 8 e 16 (parcialmente). Na figura 11 apresentamos exemplo de mutação p.P286R no gene *POLE*, encontrada na amostra 3.

Figura 11 - Detecção da mutação somática c.857C>G; p.P286R no gene *POLE*



Legenda: Imagem do software IGV demonstrando as leituras obtidas por NGS de *amplicon*, destacando a posição da mutação na qual a troca genômica G>C é observada em 27% das leituras (o gene *POLE* é codificado na fita menos, e a troca no DNA codificante é C>G).

Ainda, referente aos casos com marcação heterogênea, a tabela 8 demonstra as informações de revisão histológica e seguimento clínico das 16 amostras.

Tabela 8 - Dados histológicos e clínicos dos 16 pacientes com marcação heterogênea da expressão proteínas relacionadas aos genes de reparo do DNA.

| Caso | Histologia | IVL | MELF | Grau | IVM | LND | EP | Adj | Status |
|------|------------|----------|----------|------|------|-----------|-------|--------------|--------|
| 1 | CE | Positiva | Negativa | 3 | ≥50% | 0/44 | T2 | RT | VD |
| 2 | CE | Negativa | Negativa | 1 | <50% | 0/2 | T1A | RT | VD |
| 3 | CE | Positiva | Positiva | 3 | ≥50% | 0/61 | T1B | RT | VD |
| 4 | Seroso | Negativa | NA | 3 | <50% | 0/48 | T1A | | VD |
| 5 | CE | Negativa | Negativa | 1 | <50% | 0/59 | T1A | | VD |
| 6 | CE | Negativa | Negativa | 1 | <50% | 0/4 | T1A | | VD |
| 7 | CE | Negativa | Negativa | 1 | <50% | 0/2 | T1A | | VD |
| 8 | CE | Negativa | Positiva | 1 | <50% | -- | T1A | | VD |
| 9 | CE | Negativa | Negativa | 1 | <50% | 0/14 | T1A | BT | VD |
| 10 | CE | Positiva | Positiva | 2 | <50% | 0/89 | T1B | BT/RT | VD |
| 11 | CE | Negativa | Negativa | 1 | <50% | 0/32 | T1B | BT | VD |
| 12 | CE | Negativa | Negativa | 1 | <50% | 0/44 | T1A | | VD |
| 13 | CE | Negativa | Negativa | 1 | <50% | 0/2 | T1A | | VD |
| 14 | CE | Negativa | Negativa | 1 | <50% | 0/20 | T1A | BT | VD |
| 15 | CE | Positiva | Positiva | 1 | <50% | 12/8 4 | T1A | BT/RT/ QT | VD |
| 16 | CE | Positiva | Positiva | 2 | ≥50% | 2/19 | TIIC1 | BT/RT | VDes |

Legenda: IVL: invasão vascular; IVM: invasão miométrio; LND: linfonodo; EP: estadiamento patológico; ADJ: adjuvância; CE: carcinoma endometriode; RT: radioterapia; BT: braquiterapia; QT: quimioterapia; VD: Vivo sem evidência de doença; VDes: vivo com status da doença desconhecido.

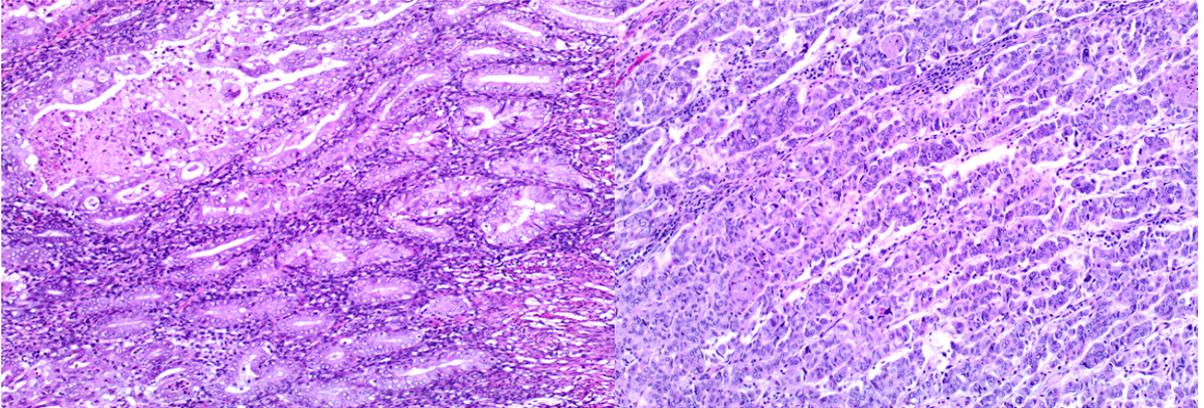
5. Discussão

Os subgrupos moleculares propostos pelo TCGA foram fundamentais na evolução do modelo dualístico de Bokhman para um sistema mais refinado e de base molecular. As recomendações de tratamento adjuvante provavelmente sofrerão um impacto significativo com a adoção da classificação molecular integrada do câncer de endométrio. Atualmente, a terapia adjuvante tem sido cada vez mais adaptada a fatores prognósticos em uma tentativa de evitar o tratamento excessivo e selecionar mulheres para tratamento adjuvante que causarão redução clinicamente relevante no risco de recorrência (24, 25).

Existe uma proposta de classificação binária nos carcinomas de endométrio, incorporando as quatro subcategorias genômicas propostas pelo TCGA, em dois subtipos: baixo grau (tumores grau 1 e 2) e alto grau (tumores grau 3). Essa classificação morfológica e molecular pode ser realizada em espécimes de biópsia histeroscópicas, assim como de peças cirúrgicas. Essa subclassificação pode auxiliar na prática clínica, independente de outras variáveis que também implicam em prognóstico (26).

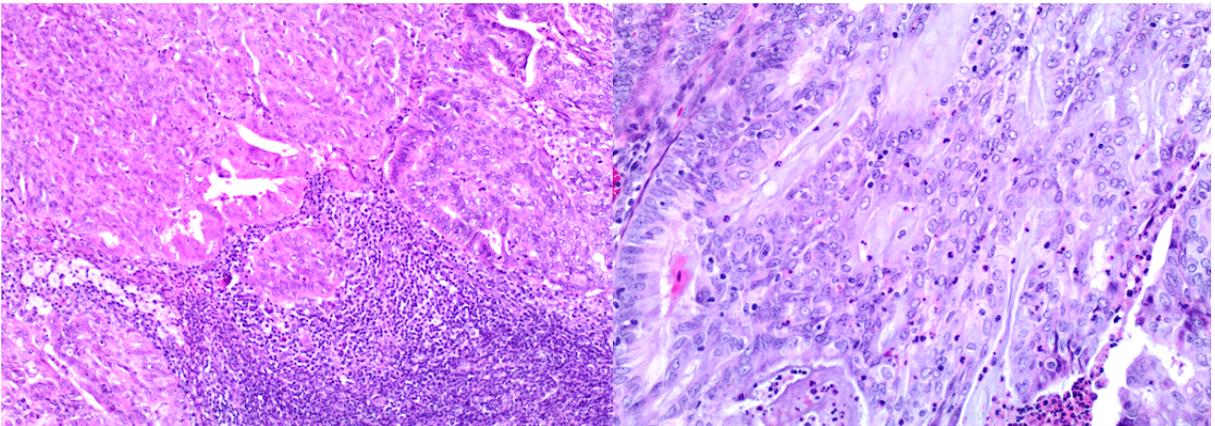
Características morfológicas podem auxiliar e prever qual fenótipo molecular a neoplasia irá exibir. No fenótipo ultramutado se observam frequentemente características como idade precoce, morfologia ambígua e infiltrado inflamatório proeminente (Figura 12). O fenótipo de instabilidade de microssatélites, em geral, apresenta metaplasia mucinosa e infiltrado inflamatório proeminente (Figura 13). O fenótipo de baixo número de cópias apresenta morfologia endometriode, baixo grau e abundante metaplasia escamosa (Figura 14). O fenótipo de alto número de cópias, por sua vez, exibe um padrão seroso-like, com papilas proeminentes e atipia citológica intensa (Figura 15) (14).

Figura 12 - Fenótipo ultramutado



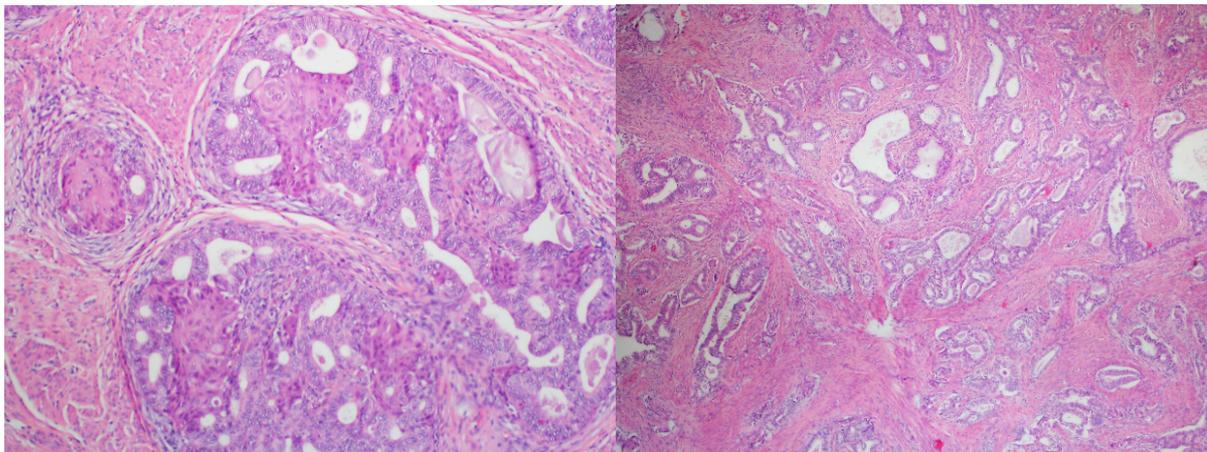
Legenda: Mutação em *POLE* com infiltrado inflamatório proeminente e morfologia ambígua. Coloração HE aumento 20x.

Figura 13 - Fenótipo instabilidade microssatélites.



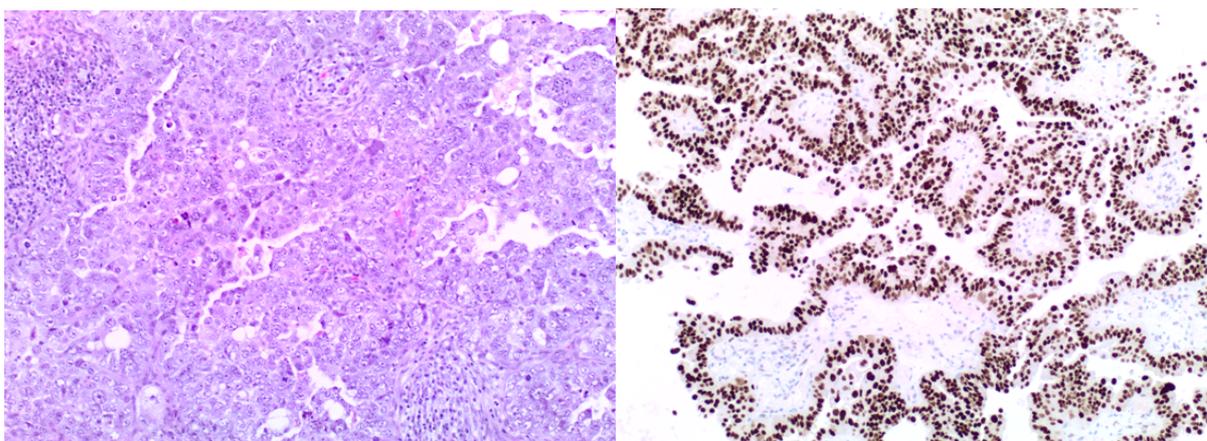
Legenda: Associado a perda dos genes de reparo, com infiltrado inflamatório proeminente e metaplasia mucinosa. Coloração HE aumento 10x/20x

Figura 14 – Fenótipo baixo número de cópias.



Legenda: Carcinoma endometriode com invasão do miométrio e diferenciação escamosa. Coloração HE aumento 20x/4x

Figura 15 – Fenótipo alto número de cópias.

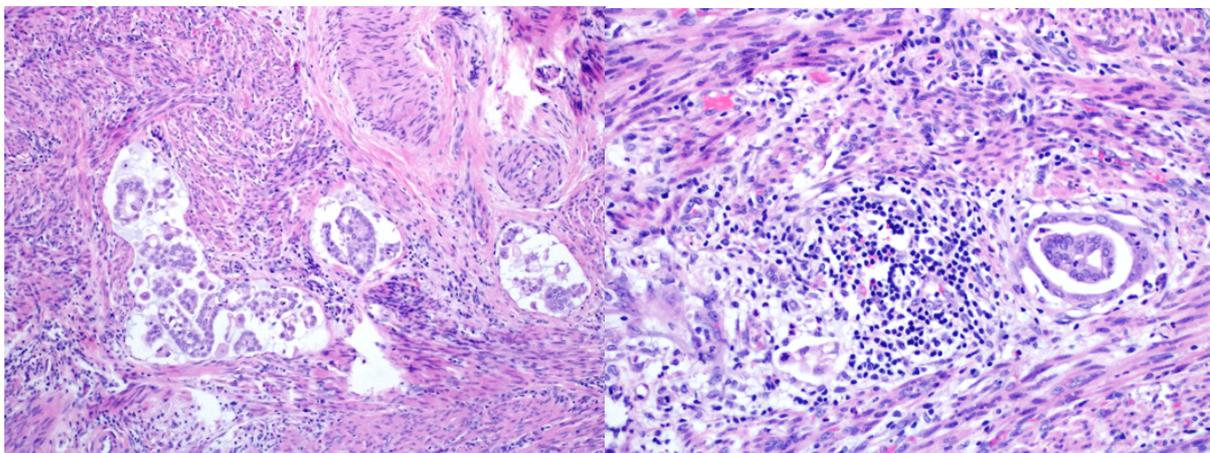


Legenda: Histologia de carcinoma de endométrio tipo seroso, com marcação padrão aberrante do p53. Coloração HE e imuno-histoquímica aumento 20x.

O padrão de infiltração tipo MELF foi descrito como invasão por um único ou pequeno grupo (três ou menos) de glândulas com contornos irregulares com ou sem resposta estromal (27-28). Este padrão de invasão indica mau prognóstico, pois está associado a maior índice de invasão angiolinfática e recorrência tumoral. Está associada a expressão aumentada de marcadores de células-tronco (CD44 e CD133) e com perda de receptores de estrogênio,

progesterona e E-caderina (29). O padrão MELF foi avaliado em todos os casos com morfologia endometriode, havendo correlação com a perda da expressão das proteínas dos genes de reparo, em análise que apresentou significância estatística. Esta é uma característica importante de ser avaliada nas peças cirúrgicas de histerectomias (Figura 16).

Figura 16 – Invasão angiolinfática e padrão de infiltração tipo MELF.



Legenda: Presença de glândulas tumorais ocupando espaços císticos nas traves do miométrio com infiltrado linfocitário perilesional. Coloração HE aumento 10x/20x.

Ademais, observa-se que existe correlação entre morfologia, subtipos moleculares e prognóstico. Em consonância com outros estudos (30, 31), o subtipo morfológico seroso, com fenótipo molecular alto número de cópias (p53 padrão mutado), apresentou significância estatística na análise univariada para invasão do miométrio mais profunda, grau da FIGO mais elevado, presença de invasão angiolinfática e comprometimento de anexos. Estes fatores são concorrentes, conforme observado, em uma sobrevida global inferior em comparação com outros subgrupos moleculares e genômicos. É importante observar que a histologia se alinha com o status do p53 e que existem estudos que mostram alta concordância (95%)

interobservador nos diagnósticos morfológicos. Nestas evidências, a quimioterapia tem se mostrado eficaz nesses subtipos (32).

Uma marcação que pode ser observada em coloração imuno-histoquímica do p53 é a expressão subclonal, assim como ocorre com as proteínas dos genes de reparo. Essa marcação pode variar de 5,1% a 8,2% dependendo do estudo. A morfologia não foi capaz de prever esses casos, que geralmente estão associados a histologia endometriode, não representando um pior prognóstico (32). Nosso estudo não foi capaz de avaliar essa subclonalidade, uma vez que realizamos a marcação de p53 na maioria dos casos, em blocos de TMA.

Em relação às curvas de sobrevida global, também, em nossa amostra, manteve-se consonância com a literatura (33, 34). Características classicamente de mau prognóstico guardaram significância estatística quando avaliadas as curvas de sobrevida. Grau da FIGO, invasão do miométrio $\geq 50\%$, invasão angiolinfática, linfonodos positivos e comprometimento de anexos todos foram fatores de pior prognóstico em nossa amostra, sempre com significância estatística.

A análise de sobrevida global em relação às características moleculares apresentou semelhança com as características de prognóstico em relação a cada fenótipo molecular descrito pelo TCGA (12). Houve melhor prognóstico nos casos sem perda de genes de reparo, que podem ser classificados em fenótipos ultramutados ou baixo número de cópias. Os casos com perda de genes de reparo apresentaram prognóstico intermediário, enquanto o fenótipo alto número de cópias, prognóstico ruim. Nosso estudo se limitou a realização de *POLE* apenas nos casos com expressão heterogênea dos genes de reparo, não sendo possível diferenciar o fenótipo molecular neste subgrupo.

Serão necessários estudos posteriores para avaliação de toda a amostra e adequada avaliação de cada subgrupo molecular. As limitações iniciais para essa avaliação global foram

principalmente custos para sequenciamento das 240 amostras que foram genes de reparo proficientes, não sendo possível, nesses casos, classificar as pacientes em fenótipo ultramutado ou fenótipo baixo número de cópias.

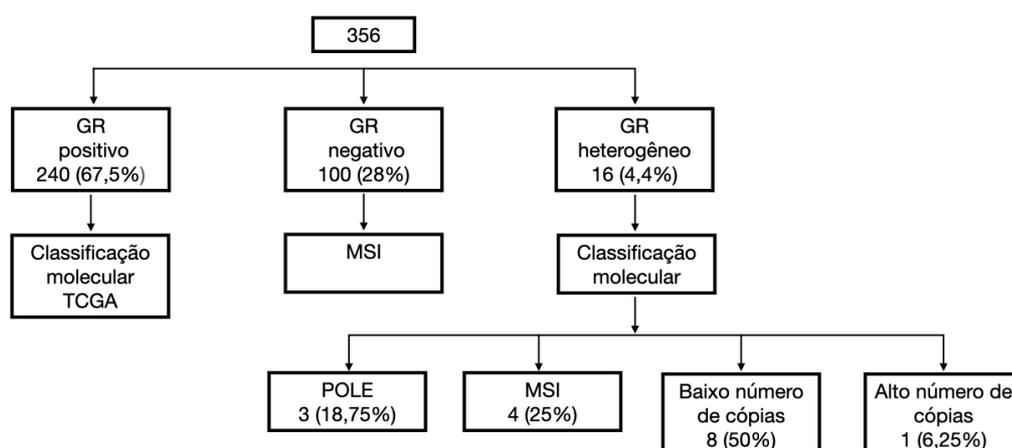
Objetivamente, conseguimos classificar nossos 16 casos com expressão heterogênea nos 4 subtipos identificados pelo TCGA:

- Fenótipo ultramutado: 3 casos
- Fenótipo instabilidade de microssatélites: 4 casos
- Fenótipo baixo número de cópias: 8 casos
- Fenótipo alto número de cópias: 1 caso

Os resultados de imuno-histoquímica geralmente são relatados de maneira dicotômica (ou seja, expressão “preservada” ou “perdida”). O termo “perdido” se aplica aos casos em que há ausência completa de coloração no epitélio do tumor, com estroma circundante servindo como controle interno positivo. Quando a coloração é heterogênea (ou seja, irregular fraca ou multifocal), o caso é geralmente classificado com a terminologia “preservado” (35). Em nosso estudo, essa marcação heterogênea apresentou eventos biológicos na evolução tumoral. A expressão heterogênea pode ser um fenômeno biológico impulsionado por metilação epigenética esporádica.

Nesta amostra a prevalência de casos com expressão heterogênea das proteínas dos genes de reparo foi de 4,4%. Desta maneira, propomos um algoritmo complementar ao PROMISE, que pode auxiliar no melhor entendimento e classificação molecular destes casos (Figura 17):

Figura 17 - Algoritmo de acordo com o padrão de expressão heterogêneo das proteínas de genes de reparo.



Legenda - GR: Genes de Reparo. MSI: Instabilidade de Microssatélites.

Neste algoritmo, descrevemos o número total de casos estudados (356 amostras), separando em três subgrupos: 1) Genes de reparo positivo; 2) Genes de reparo negativo; e 3) Genes de reparo heterogêneo. O grupo 1 seguiria para a classificação molecular proposta pelo PROMISE, que em nosso estudo, foram 240 (67,5%) amostras. O grupo 2 seria classificado como fenótipo instabilidade de microssatélites (100 - 28% das amostras). O grupo 3, com expressão heterogênea (16 - 4,5% das amostras), também seguiriam para classificação molecular, como foi realizado nesse estudo.

Os dados extraídos das análises moleculares e consequente classificação molecular dessas neoplasias com marcação heterogênea divergem da literatura em relação a porcentagem de casos em cada fenótipo molecular nos casos com padrão habitual de marcação de genes de reparo. A prevalência dos tumores grau 3 de FIGO apresentaram a seguinte prevalência: 40% fenótipo instabilidade de microssatélites; 30% fenótipo baixo número de cópias; 18% fenótipo alto número de cópias e 12% fenótipo ultramutado (6).

Dentre os pacientes com marcação heterogênea foi observado que a maioria apresentava histologia endometriode (15 casos – 93,75%), grau da FIGO I e II (13 casos – 81,25%), assim como invasão do miométrio menor que 50% (13 casos – 81,25%). Desta maneira, infere-se que houve uma proporção maior de número de casos considerados de baixo risco para recidiva ou morte pela doença nos pacientes com marcação heterogênea. Entretanto, 7 pacientes receberam tratamento adjuvante apesar de serem consideradas de baixo risco. Neste contexto, a classificação molecular pode ser útil para delinear o tratamento pós cirúrgico e minimizar toxicidades para os pacientes.

Três pacientes apresentaram mutação em *POLE*, um achado de melhor prognóstico baseado nos dados do TCGA. Todos receberam tratamento adjuvante, sendo dois deles, tumores de baixo grau. Propõe-se desta maneira, avaliar detalhadamente pacientes com esse perfil e talvez evitar radioterapia, ou até mesmo quimioterapia e todas as toxicidades associadas a estes tratamentos.

A mutação no domínio da exonuclease do DNA polimerase pode levar a uma revisão prejudicada durante a síntese de DNA, resultando em um aumento dramático na taxa de mutação, sendo uma possível explicação para os casos heterogêneos, que não tiveram instabilidade de microssatélites (20, 21). Mutações no domínio da exonuclease do *POLE* podem ocorrer em até 15% dos carcinomas endometrioides grau 3, e mesmo sendo uma

neoplasia de alto grau, pode estar associada a um desfecho muito favorável. A taxa de mutações excessivamente alta impede a evolução intencional e ideal do tumor, podendo apresentar funções subótimas em relação as mutações clássicas (36).

Uma associação observada foi a presença de invasão vascular nos casos que apresentaram instabilidade de microssatélites e marcação heterogênea. Ambos receberam tratamento adjuvante, podendo se beneficiar inclusive de imunoterapia numa possível recidiva frente aos dados recentes em pacientes com instabilidade de microssatélites.

Outro dado relevante é a metilação de *MLH1*, casos com essa alteração podem ser classificados no grupo de instabilidade de microssatélites. A doença esporádica é a forma mais comum de apresentação do carcinoma de endométrio e os casos com perda de genes de reparo, mais frequentemente estão associados a metilação do promotor de *MLH1*. Tumores com razão de metilação $> 0,15$ (correspondendo a 15% do DNA metilado) na região C e/ou na região D foram considerados hipermetilados. Estudos sugerem as pacientes com metilação de *MLH1* tem menor sobrevida específica livre de doença comparada às com perda de genes de reparo em geral, porém podem demonstrar melhor resposta a tratamento adjuvante (radioterapia e quimioterapia), comparado aos carcinomas de endométrio com perda de genes de reparo não metilados (37, 38, 39).

Observamos que a maioria dos casos (9 – 56,25%) apresentou perda heterogênea na proteína do gene de reparo *MSH6*, o que vai de encontro a alguns estudos, principalmente em câncer colorretal. Notou-se, em alguns estudos, que essa alteração estava relacionada a mutações *frameshift* no trato da policitosina (instabilidade C8), avaliadas a partir de DNA extraído de áreas de perda *MSH6* (20, 21).

A avaliação de instabilidade de microssatélites realizado através do teste Idylla apresentou uma alta taxa de concordância em relação a imuno-histoquímica. Estudos em

câncer colorretal mostraram sensibilidade de 100%. Em câncer de endométrio demonstraram sensibilidade de 72,7%. Essa menor concordância em endométrio ocorre principalmente em casos com deficiência de MSH6 (40). Outros estudos, porém, sugerem que essa concordância com o teste Idylla em comparação com a imuno-histoquímica, apresentou sensibilidade e especificidade de até 100% (41). Em nosso estudo, nos casos com perda heterogênea, dois deles foram MSI (1 e 15), não sendo possível afirmar uma alta correlação de perda heterogênea com instabilidade de microssatélites, sendo necessárias, além da avaliação do MSI, avaliação de POLE e metilação do promotor de MLH1. A discordância da perda heterogênea dos genes de reparo do DNA com instabilidade de microssatélites pode estar associada a hipermetilação do promotor de MLH1, indicando heterogeneidade intratumoral esporádica (42).

Um ponto importante a ser notado são casos que apresentaram dois ou mais fenótipos moleculares. Um grupo pequeno de casos (3-6%), mas clinicamente relevante, tem sido descrito com essa alteração, denominada “*multiple classifier*” (43). Os casos 9 e 16 apresentaram mutação em *POLE* e metilação em *MLH1*. O caso 14 apresentou metilação em *MLH1* e padrão p53 aberrante. A mudança de base e proporção *indel* de cânceres de endométrio com *POLE* mutagênico e MSI são semelhantes ao câncer de endométrio com *POLE* mutagênico, com estabilidade de microssatélites. Em relação ao caso 14, sugere-se que mutação do p53 é um evento passageiro, não afetando o comportamento biológico e grupo molecular da neoplasia, além de características histológicas que favorecem neoplasia endometriode (linfócitos intratumorais, metaplasia escamosa), em vez de histologia serosa. (43, 44).

Está estabelecido que as moléculas de reparo de incompatibilidade do DNA são biomarcadores com relevância clínica muito ampla, ou seja, afetam os três principais aspectos

clínicos: risco de câncer (como nas síndromes hereditárias - Lynch), prognóstico e previsão de tratamento (45). A abordagem inicial se dá por meio da pesquisa imuno-histoquímica das proteínas dos genes de reparo (MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6), as quais são amplamente usadas principalmente em carcinoma colorretal e carcinoma de endométrio. Em ambas as neoplasias, a mutação pode ser esporádica ou hereditária.

A Síndrome de Lynch é uma síndrome de predisposição ao câncer, autossômica dominante, causada pela mutação da linhagem germinativa dos genes de reparo do DNA. Está presente em até 4% dos carcinomas colorretais e 5% dos carcinomas endometriais (46). A identificação de pacientes com essa entidade é importante para o manejo clínico, prognóstico e triagem de familiares. A expressão heterogênea das proteínas dos genes de reparo pode estar associada a Síndrome de Lynch, porém, estudos mais aprofundados precisam ser realizados nas amostras da nossa pesquisa.

O tratamento tradicional de mulheres com câncer ginecológico se baseia em cirurgia, quimioterapia e radioterapia, individualmente ou em combinação, conforme ditado pelas circunstâncias clínicas, como o estágio da doença. Alguns aspectos morfológicos, por exemplo, linfócitos infiltrantes e peritumorais, podem estar associados a instabilidade de microssatélites e podem ser considerados como biomarcadores preditivos de resposta a tratamento com imunoterapia (47, 48). O fenótipo ultramutado (mutação no gene *POLE*), também está associado a aumento da expressão de PD-1 e PD-L1, levantando a possibilidade de tratamento com imunoterapia com inibidores de checkpoints imunológicos (49).

A caracterização genômica abrangente melhorou nossa compreensão do câncer de endométrio e revelou novas estratégias para terapia direcionada. A capacidade de direcionar terapias a subgrupos específicos de pacientes provavelmente melhorará os resultados do tratamento, diminuirá os efeitos colaterais e aumentará a relação custo-benefício. Pacientes

com mutação em *POLE* ou MSI com doença metastática progressiva, tratadas com imunoterapia, mostraram uma rápida resposta ao tratamento, exibiram regressão parcial da massa tumoral e tiveram resposta sustentada por 7 a 14 meses, respectivamente (50).

Considerando que pacientes que apresentam instabilidade em microssatélites ou com mutações em *POLE* podem se beneficiar de tratamento com imunoterapia, sugere-se que a avaliação molecular de casos com marcação heterogênea das proteínas relacionadas aos genes de reparo de DNA é necessária. Em nosso estudo é factível que 43,75% (*POLE* e MSI) dos casos – que inicialmente não teriam indicação de imunoterapia – possam ser tratadas com inibidores de checkpoint imunológico em recidivas, além do tratamento convencional no tumor primário.

6. Conclusão

- Foram estudados 16 casos com expressão heterogênea dos genes de reparo, de um total de 356 amostras selecionadas para o estudo. Esses casos tiveram a avaliação molecular realizada através de imuno-histoquímica e técnicas genéticas.
- Ambas as áreas proficientes e deficientes de genes de reparo de cada caso heterogêneo foram comparadas molecularmente, sendo que a maioria (15 - 93,75% dos casos), apresentavam o mesmo fenótipo molecular.
- As características clínico-patológicas e moleculares dos casos heterogêneos, foram semelhantes aos adenocarcinomas de endométrio sem marcação subclonal, incluindo a análise de sobrevida e evolução da doença.
- Obtivemos uma mudança de 43,75% na classificação molecular dos adenocarcinomas de endométrio com expressão heterogênea dos genes de reparo, que poderia ter auxiliado no tratamento e prognóstico, diminuindo exposição a quimioterapia, ou até mesmo, indicando imunoterapia.

Com a análise dos tumores com fenótipo heterogêneo de expressão dos genes de reparo do DNA torna-se factível descrever uma nova categoria biológica de tumores de endométrio, previamente não classificada dentre os grupos histológicos e moleculares. Não existe consistência destes tumores na classificação prevista pelo TCGA, de modo que uma parcela se assemelha àqueles com fenótipo ultramutado em detrimento ao esperado, que seria o fenótipo de instabilidade de microssatélites.

A avaliação dos casos com marcação heterogênea tem impacto importante não apenas no entendimento da biologia e evolução dos tumores endometriais, mas também para

determinar o impacto prognóstico em novas terapias, sobretudo imunoterapia, que já demonstrou grande eficácia no cenário metastático em pacientes com tumores que apresentam instabilidade de microssatélites, mutações em *POLE* e alta carga mutacional.

Em conclusão, sugerimos que a análise molecular deva ser realizada em todos os casos com marcação heterogênea para a expressão de proteínas relacionadas aos genes de reparo do DNA para determinar adequadamente as características intrínsecas de cada tumor. Devido à raridade desse achado, isso é financeiramente viável e tem o potencial de mudar a prática clínica em um subconjunto de pacientes. Expressão heterogênea deve ser relatado como um padrão distinto e, portanto, ser avaliado de forma diferente dos tumores classificados anteriormente em outras categorias.

7. REFERÊNCIAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.
2. NATIONAL CANCER INSTITUTE. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Disponível em <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/corp.html>. Acesso em 21 de março de 2021.
3. Dubil EA, Tian C, Wang G, Tarney CM, Bateman NW, Levine DA, Conrads TP, Hamilton CA, Maxwell GL, Darcy KM. Racial disparities in molecular subtypes of endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2018 Apr;149(1):106-116. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.12.009. PMID: 29605044.
4. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2020. Disponível em: inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf. Acesso em 19 de novembro de 2021.
5. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, Li-Chang HH, Kwon JS, Melnyk N, Yang W, Senz J, Boyd N, Karnezis AN, Huntsman DG, Gilks CB, McAlpine JN. A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. *Br J Cancer.* 2015 Jul 14;113(2):299-310.
6. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Female genital tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer, 2020. (WHO classification on tumours series, 5th ed., vol. 4). Disponível em: <https://publications.iarc.fr/592>. Acesso em 19 de novembro de 2021.

7. Holloway RW, Abu-Rustum NR, Backes FJ, Boggess JF, Gotlieb WH, Jeffrey Lowery W, Rossi EC, Tanner EJ, Wolsky RJ. Sentinel lymph node mapping and staging in endometrial cancer: A Society of Gynecologic Oncology literature review with consensus recommendations. *Gynecol Oncol*. 2017;146(2):405-415.
8. Hoang LN, Kinloch MA, Leo JM, Grondin K, Lee CH, Ewanowich C, Köbel M, Cheng A, Talhouk A, McConechy M, Huntsman DG, McAlpine JN, Soslow RA, Gilks CB. Interobserver Agreement in Endometrial Carcinoma Histotype Diagnosis Varies Depending on The Cancer Genome Atlas (TCGA)-based Molecular Subgroup. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(2):245-252.
9. Hussein YR, Soslow RA. Molecular insights into the classification of high-grade endometrial carcinoma. *Pathology*. 2018;50(2):151-161.
10. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, Yang W, Lum A, Senz J, Boyd N, Pike J, Anglesio M, Kwon JS, Karnezis AN, Huntsman DG, Gilks CB, McAlpine JN. Confirmation of ProMisE: A simple, genomics-based clinical classifier for endometrial cancer. *Cancer*. 2017 Mar 1;123(5):802-813. doi: 10.1002/cncr.30496. Epub 2017 Jan 6. PMID: 28061006.
11. Bosse T, Nout RA, McAlpine JN, McConechy MK, Britton H, Hussein YR, Gonzalez C, Ganesan R, Steele JC, Harrison BT, Oliva E, Vidal A, Matias-Guiu X, Abu-Rustum NR, Levine DA, Gilks CB, Soslow RA. Molecular Classification of Grade 3 Endometrioid Endometrial Cancers Identifies Distinct Prognostic Subgroups. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(5):561-568.
12. Parra-Herran C, Lerner-Ellis J, Xu B, Khalouei S, Bassiouny D, Cesari M, Ismiil N, Nofech-Mozes S. Molecular-based classification algorithm for endometrial carcinoma

- categorizes ovarian endometrioid carcinoma into prognostically significant groups. *Mod Pathol.* 2017;30(12):1748-1759.
13. Murali R, Soslow RA, Weigelt B. Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *Lancet Oncol.* 2014;15(7):e268-78.
 14. Haruma T, Nagasaka T, Nakamura K, Haraga J, Nyuya A, Nishida T, Goel A, Masuyama H, Hiramatsu Y. Clinical impact of endometrial cancer stratified by genetic mutational profiles, POLE mutation, and microsatellite instability. *PLoS One.* 2018;13(4):e0195655.
 15. Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, Robertson AG, Pashtan I, Shen R, Benz CC, Yau C, Laird PW, Ding L, Zhang W, Mills GB, Kucherlapati R, Mardis ER, Levine DA. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature.* 2013;497(7447):67-73.
 16. Chapel DB, Yamada SD, Cowan M, Lastra RR. Immunohistochemistry for mismatch repair protein deficiency in endometrioid endometrial carcinoma yields equivalent results when performed on endometrial biopsy/curettage or hysterectomy specimens. *Gynecol Oncol.* 2018;149(3):570-574.
 17. Visser NCM, van der Wurff AAM, Pijnenborg JMA, Massuger LFAG, Bulten J, Nagtegaal ID. Tissue microarray is suitable for scientific biomarkers studies in endometrial cancer. *Virchows Arch.* 2018;472(3):407-413.
 18. Casey L, Singh N. POLE, MMR, and MSI Testing in Endometrial Cancer: Proceedings of the ISGyP Companion Society Session at the USCAP 2020 Annual Meeting. *Int J Gynecol Pathol.* 2021;40(1):5-16.
 19. Malapelle U, Parente P, Pepe F, De Luca C, Pisapia P, Sgariglia R, Nacchio M, Gragnano G, Russo G, Conticelli F, Bellevicine C, Vigliar E, Iaccarino A, Covelli C, Balistreri M,

- Clemente C, Perrone G, Danza A, Scaramuzzi F, Fassan M, Troncone G, Graziano P. Evaluation of Micro Satellite Instability and Mismatch Repair Status in Different Solid Tumors: A Multicenter Analysis in a Real-World Setting. *Cells*. 2021;10(8):1878.
20. Graham RP, Kerr SE, Butz ML, Thibodeau SN, Halling KC, Smyrk TC, Dina MA, Waugh VM, Rumilla KM. Heterogenous MSH6 loss is a result of microsatellite instability within MSH6 and occurs in sporadic and hereditary colorectal and endometrial carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(10):1370-6.
 21. Chen W, Pearlman R, Hampel H, Pritchard CC, Markow M, Arnold C, Knight D, Frankel WL. MSH6 immunohistochemical heterogeneity in colorectal cancer: comparative sequencing from different tumor areas. *Hum Pathol*. 2020;96:104-111.
 22. Watson N, Grieu F, Morris M, Harvey J, Stewart C, Schofield L, Goldblatt J, Iacopetta B. Heterogeneous staining for mismatch repair proteins during population-based prescreening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Mol Diagn*. 2007;9(4):472-8.
 23. McCarthy AJ, Capo-Chichi JM, Spence T, Grenier S, Stockley T, Kamel-Reid S, Serra S, Sabatini P, Chetty R. Heterogenous loss of mismatch repair (MMR) protein expression: a challenge for immunohistochemical interpretation and microsatellite instability (MSI) evaluation. *J Pathol Clin Res*. 2019;5(2):115-129.
 24. Vermij L, Smit V, Nout R, Bosse T. Incorporation of molecular characteristics into endometrial cancer management. *Histopathology*. 2020;76(1):52-63.
 25. McAlpine J, Leon-Castillo A, Bosse T. The rise of a novel classification system for endometrial carcinoma; integration of molecular subclasses. *J Pathol*. 2018;244(5):538-549.

26. Soslow RA, Tornos C, Park KJ, Malpica A, Matias-Guiu X, Oliva E, Parkash V, Carlson J, McCluggage WG, Gilks CB. Endometrial Carcinoma Diagnosis: Use of FIGO Grading and Genomic Subcategories in Clinical Practice: Recommendations of the International Society of Gynecological Pathologists. *Int J Gynecol Pathol*. 2019 Jan;38 Suppl 1(Iss 1 Suppl 1):S64-S74.
27. Prodromidou A, Vorgias G, Bakogiannis K, Kalinoglou N, Iavazzo C. MELF pattern of myometrial invasion and role in possible endometrial cancer diagnostic pathway: A systematic review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2018;230:147-152.
28. Quick CM, May T, Horowitz NS, Nucci MR. Low-grade, low-stage endometrioid endometrial adenocarcinoma: a clinicopathologic analysis of 324 cases focusing on frequency and pattern of myoinvasion. *Int J Gynecol Pathol*. 2012;31(4):337-43.
29. Mateva S, Nikolova M, Yordanov A. Patterns of Myometrial Invasion in Endometrial Adenocarcinoma with Emphasizing on Microcystic, Elongated and Fragmented (MELF) Glands Pattern: A Narrative Review of the Literature. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(9):1707.
30. Kang EY, Wiebe NJ, Aubrey C, et al. Selection of endometrial carcinomas for p53 immunohistochemistry based on nuclear features [published online ahead of print, 2021 Oct 1]. *J Pathol Clin Res*. 2021;10.1002/cjp2.243.
31. Murali R, Davidson B, Fadare O, Carlson JA, Crum CP, Gilks CB, Irving JA, Malpica A, Matias-Guiu X, McCluggage WG, Mittal K, Oliva E, Parkash V, Rutgers JKL, Staats PN, Stewart CJR, Tornos C, Soslow RA. High-grade Endometrial Carcinomas: Morphologic and Immunohistochemical Features, Diagnostic Challenges and Recommendations. *Int J Gynecol Pathol*. 2019;38 Suppl 1(Iss 1 Suppl 1):S40-S63.

32. Kang EY, Wiebe NJ, Aubrey C, Lee CH, Anglesio MS, Tilley D, Ghatage P, Nelson GS, Lee S, Köbel M. Selection of endometrial carcinomas for p53 immunohistochemistry based on nuclear features. *J Pathol Clin Res*. 2022 Jan;8(1):19-32. doi: 10.1002/cjp2.243. Epub 2021 Oct 1. PMID: 34596362; PMCID: PMC8682942.
33. Euscher E, Fox P, Bassett R, Al-Ghawi H, Ali-Fehmi R, Barbuto D, Djordjevic B, Frauenhoffer E, Kim I, Hong SR, Montiel D, Moschiano E, Roma A, Silva E, Malpica A. The pattern of myometrial invasion as a predictor of lymph node metastasis or extrauterine disease in low-grade endometrial carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(11):1728-36.
34. Ballester M, Bendifallah S, Daraï E. Nouvelles recommandations EMSO, ESGO, ESTRO sur la prise en charge des cancers de l'endomètre [European guidelines (ESMO-ESGO-ESTRO consensus conference) for the management of endometrial cancer]. *Bull Cancer*. 2017;104(12):1032-1038.
35. Watkins JC, Nucci MR, Ritterhouse LL, Howitt BE, Sholl LM. Unusual Mismatch Repair Immunohistochemical Patterns in Endometrial Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2016 Jul;40(7):909-16. doi: 10.1097/PAS.0000000000000663. PMID: 27186853.
36. Meng B, Hoang LN, McIntyre JB, Duggan MA, Nelson GS, Lee CH, Köbel M. POLE exonuclease domain mutation predicts long progression-free survival in grade 3 endometrioid carcinoma of the endometrium. *Gynecol Oncol*. 2014 Jul;134(1):15-9. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.05.006. Epub 2014 May 16. PMID: 24844595.
37. Pasanen A, Loukovaara M, Bützow R. Clinicopathological significance of deficient DNA mismatch repair and MLH1 promoter methylation in endometrioid endometrial carcinoma. *Mod Pathol*. 2020;33(7):1443-1452.

38. Cosgrove CM, Cohn DE, Hampel H, Frankel WL, Jones D, McElroy JP, Suarez AA, Zhao W, Chen W, Salani R, Copeland LJ, O'Malley DM, Fowler JM, Yilmaz A, Chassen AS, Pearlman R, Goodfellow PJ, Backes FJ. Epigenetic silencing of MLH1 in endometrial cancers is associated with larger tumor volume, increased rate of lymph node positivity and reduced recurrence-free survival. *Gynecol Oncol.* 2017;146(3):588-595.
39. Loukovaara M, Pasanen A, Bützow R. Mismatch repair protein and MLH1 methylation status as predictors of response to adjuvant therapy in endometrial cancer. *Cancer Med.* 2021 Feb;10(3):1034-1042. doi: 10.1002/cam4.3691. Epub 2021 Jan 15. PMID: 33449452; PMCID: PMC7897956.
40. Ukkola I, Nummela P, Pasanen A, Kero M, Lepistö A, Kytölä S, Bützow R, Ristimäki A. Detection of microsatellite instability with Idylla MSI assay in colorectal and endometrial cancer. *Virchows Arch.* 2021 Sep;479(3):471-479. doi: 10.1007/s00428-021-03082-w. Epub 2021 Mar 23. PMID: 33755781; PMCID: PMC8448708.
41. Gilson P, Levy J, Rouyer M, Demange J, Husson M, Bonnet C, Salleron J, Leroux A, Merlin JL, Harlé A. Evaluation of 3 molecular-based assays for microsatellite instability detection in formalin-fixed tissues of patients with endometrial and colorectal cancers. *Sci Rep.* 2020 Oct 2;10(1):16386. doi: 10.1038/s41598-020-73421-5. PMID: 33009475; PMCID: PMC7532161.
42. Stelloo E, Jansen AML, Osse EM, Nout RA, Creutzberg CL, Ruano D, Church DN, Morreau H, Smit VTHBM, van Wezel T, Bosse T. Practical guidance for mismatch repair-deficiency testing in endometrial cancer. *Ann Oncol.* 2017 Jan 1;28(1):96-102. doi: 10.1093/annonc/mdw542. PMID: 27742654.
43. León-Castillo A, Gilvazquez E, Nout R, Smit VT, McAlpine JN, McConechy M, Kommos S, Brucker SY, Carlson JW, Epstein E, Rau TT, Soslow RA, Ganesan R, Matias-Guiu X,

- Oliva E, Harrison BT, Church DN, Gilks CB, Bosse T. Clinicopathological and molecular characterisation of 'multiple-classifier' endometrial carcinomas. *J Pathol.* 2020;250(3):312-322.
44. León-Castillo A, Britton H, McConechy MK, McAlpine JN, Nout R, Kommos S, Brucker SY, Carlson JW, Epstein E, Rau TT, Bosse T, Church DN, Gilks CB. Interpretation of somatic POLE mutations in endometrial carcinoma. *J Pathol.* 2020;250(3):323-335.
45. Rüschoff J, Baretton G, Bläker H, Dietmaier W, Dietel M, Hartmann A, Horn LC, Jöhrens K, Kirchner T, Knüchel R, Mayr D, Merkelbach-Bruse S, Schildhaus HU, Schirmacher P, Tiemann M, Tiemann K, Weichert W, Büttner R. MSI testing : What's new? What should be considered? *Pathologe.* 2021 Nov;42(Suppl 1):110-118. English. doi: 10.1007/s00292-021-00948-3. Epub 2021 Sep 3. PMID: 34477921.
46. Sarode VR, Robinson L. Screening for Lynch Syndrome by Immunohistochemistry of Mismatch Repair Proteins: Significance of Indeterminate Result and Correlation With Mutational Studies. *Arch Pathol Lab Med.* 2019 Oct;143(10):1225-1233. doi: 10.5858/arpa.2018-0201-OA. Epub 2019 Mar 27. PMID: 30917047.
47. Murali R, Grisham RN, Soslow RA. The roles of pathology in targeted therapy of women with gynecologic cancers. *Gynecol Oncol.* 2018;148(1):213-221.
48. Sloan EA, Moskaluk CA, Mills AM. Mucinous Differentiation With Tumor Infiltrating Lymphocytes Is a Feature of Sporadically Methylated Endometrial Carcinomas. *Int J Gynecol Pathol.* 2017;36(3):205-216.
49. Mehnert JM, Panda A, Zhong H, Hirshfield K, Damare S, Lane K, Sokol L, Stein MN, Rodriguez-Rodriguez L, Kaufman HL, Ali S, Ross JS, Pavlick DC, Bhanot G, White EP, DiPaola RS, Lovell A, Cheng J, Ganesan S. Immune activation and response to

pembrolizumab in POLE-mutant endometrial cancer. *J Clin Invest*. 2016;126(6):2334-40.

50. Chang Z, Talukdar S, Mullany SA, Winterhoff B. Molecular characterization of endometrial cancer and therapeutic implications. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2019 Feb;31(1):24-30. doi: 10.1097/GCO.0000000000000508. PMID: 30507624.

8. ANEXOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C. Camargo Cancer Center/ Fundação Antônio Prudente, sob o nº 2587/18. (Anexo 1



COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de 07/08/2018, **aprovaram** a realização do projeto nº. 2587/18 intitulado: "Estudo imuno-histoquímico e classificação molecular dos adenocarcinomas de endométrio com expressão heterogênea dos genes de reparo do DNA."

Pesquisador responsável: Louise de Brot Andrade
Aluno: Grazielle Bovolim (Doutorado)

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 09 de agosto de 2018.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

9. EVENTOS

Os dados parciais deste projeto foram enviados à USCAP (United States & Canadian Academy of Pathology), sob a forma de resumo e foi aceito na modalidade apresentação de pôster.

Bovolim G, Silva SO, Abreu R, Gonçalves BT, Torrezan GT, Carraro DM, Corassa M, Baiocchi G, Brot LD. Heterogeneous Loss of Mismatch Repair (MMR) Protein Expression in Endometrial Carcinomas: An Unusual and Unknown Pattern With Distinct Molecular Characteristics. United States & Canadian Academy of Pathology (USCAP). 19 a 24 de março de 2022, Los Angeles-California.