Rodrigo Santa Cruz Guindalini

Identificação de variantes germinativas no gene E-caderina / *CDH1* e de fatores ambientais de risco em pacientes jovens portadores de câncer gástrico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira

Versão Corrigida

(versão original disponível na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP)

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Guindalini, Rodrigo Santa Cruz

Identificação de variantes germinativas no gene E-caderina / *CDH1* e de fatores ambientais de risco em pacientes jovens portadores de câncer gástrico / Rodrigo Santa Cruz Guindalini. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientadora: Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira.

Descritores: 1.Neoplasias gástricas 2.Síndromes neoplásicas hereditárias
3.Caderinas 4.Fatores de risco 5.Dieta

USP/FM/DBD-204/16

Dedicatória

Dedico esta obra para minha pequena princesa Júlia Gonzalez Guindalini.
Espero que sirva de exemplo e inspiração para que ela siga incansavelmente buscando por novos
conhecimentos durante toda sua vida.

Agradecimentos

Este trabalho é o resultado do esforço coletivo de profissionais acadêmicos e assistencialistas da FMUSP/ICESP, da disponibilidade dos pacientes, do carinho e ajuda dos meus familiares e amigos e da graça de Deus. Desta forma, expresso meus sinceros votos de agradecimentos a todos diretamente ou indiretamente envolvidos neste projeto.

Agradeço a minha orientadora Profa Dra Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira por todos os ensinamentos, pelo apoio e pela confiança.

Agradeço às pesquisadoras Fatima Solange Pasini, Maria Lucia Hirata Katayama e Simone Maistro que foram responsáveis pelo processamento e análise molecular dos dados.

Agradeço à equipe do Biobanco (Enf Denise Cappi, Diogo Dias Araujo e Miyuki Uno) e à equipe do Ambulatório de Câncer Hereditário do ICESP (Dra Ana Carolina Chaves, Enf Daniele Salgado e Dr Guilherme Cotti) pela ajuda no recrutamento dos pacientes.

Agradeço às alunas Marina Cândido e Priscila Branas pela ajuda na aplicação dos questionários e organização dos bancos de dados dos pacientes.

Agradeço ao Prof Dr Ulysses Ribeiro Jr e a Profa Dra Adriana Vaz Safatle Ribeiro pela coleta do material a fresco dos pacientes submetidos à endoscopia.

Agradeço aos patologistas Prof Dr Evandro Sobroza, Dra Sheila F Faraj e Profa Dra Sheila Aparecida Coelho Siqueira pelo apoio nas revisões dos exames anátomo-patológicos e leitura dos exames de imuno-histoquímica.

Agradeço às amigas do LIM-24: Giselly Encinas Zanetti, Tauana Nagy e Daniela Marques por todo apoio e disponibilidade nos meus períodos de ausência.

Agradeço a Dra Maria Del Pilar Estevez Diz e ao Prof Dr Paulo G Hoff pelo apoio e pela oportunidade de participar ativamente do Ambulatório de Câncer Hereditário do ICESP.

Agradeço ao Prof Dr Bernardo Garicochea pelos ensinamentos fundamentais teórico-práticos da oncogenética.

Agradeço a Prof Dra Funmi Olopade e a Prof Dra Sonia Kupfer pela oportunidade de aperfeiçoamento das minhas habilidades na área da oncogenética.

Agradeço a todos os pacientes e familiares que aceitaram participar do estudo, doando seu sangue, tempo e atenção a nossa equipe.

Agradeço a minha “princesa mãe” – minha esposa Fernanda Dias Gonzalez Guindalini e a minha “princesa menina” – minha filha Júlia Gonzalez Guindalini pelo apoio incondicional, pelo carinho e pelo amor em todos os momentos.

Agradeço a toda minha família, em especial minha mãe Daise Santa Cruz Guindalini, meu pai José Valdir Guindalini, minha irmã Camila Santa Cruz Guindalini que desde de pequeno me ajudam e apoiam em todos os projetos da minha vida.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial ao meu amigo-irmão André Furtado que é o responsável pelas ilustrações desta tese.

Guindalini RSC. Identificação de variantes germinativas no gene E-caderina / *CDH1* e de fatores ambientais de risco em pacientes jovens portadores de câncer gástrico [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Resumo

Introdução: Câncer gástrico é uma doença multifatorial influenciada por fatores externos e hereditários. Embora a síndrome do câncer gástrico difuso hereditário causada por mutações germinativas no gene *CDH1* seja uma condição rara, sua influência sobre a incidência de câncer gástrico no Brasil, que é considerado um país de alta incidência desta neoplasia, é desconhecida.

Objetivos: Avaliar a frequência de variantes germinativas em *CDH1* e os hábitos de dieta/estilo de vida em pacientes diagnosticados com câncer gástrico com idade precoce (<55 anos) no Brasil.

Metodologia: De outubro de 2013 a agosto 2015, foram recrutados 88 pacientes consecutivos e não aparentados diagnosticados com câncer gástrico em idade precoce em um hospital público brasileiro. Todos os éxons e regiões intrônicas flanqueadoras do *CDH1* foram sequenciados. Os hábitos de dieta/estilo de vida dos pacientes com câncer gástrico em idade precoce foram comparados com informações sobre os hábitos da população armazenados em bancos de dados populacionais brasileiros.

Resultados: Dos 88 pacientes, 51,1% eram do sexo feminino e a média de idade no momento do diagnóstico do câncer era de 39 anos (variação, 20-55); 23% relataram história familiar de câncer gástrico em parentes de primeiro ou de segundo. A maioria dos tumores era do tipo difuso (74%), pouco diferenciado (74%) e localizava-se no terço médio ou distal do estômago (67%). No total, 24 variantes germinativas foram detectadas: 3 (12.5%) benignas, 17 (70.8%) provavelmente benignas e 4 (16.7%) variantes de significado clínico incerto (VSI). Todas as VSI são mutações *missense* e nunca foram relatadas previamente na literatura: c.313T> A, c.387G> T, c.1676G> A e c.1806C> A. Os pacientes com câncer gástrico diagnosticados em idade precoce apresentaram maior consumo de carne vermelha (OR: 2.591, IC 95%: 1.371-4.894) e carne processada (OR: 3.093, IC 95%: 1.591-6.009) em comparação com os hábitos alimentares da população brasileira.

Conclusão: De acordo com o nosso conhecimento, esta é a maior série investigando a contribuição de mutações germinativas de *CDH1* em pacientes diagnosticados com câncer gástrico em idade precoce na América Latina. Para um país considerado de alta incidência, a frequência encontrada de variantes germinativas em *CDH1* foi maior do que o esperado; 4 novas mutações *missense* foram identificadas e mais estudos são necessários para confirmar a patogenicidade dessas

variantes. Fatores de risco modificáveis, como o consumo de carne vermelha e/ou de carne processada podem ter contribuído para o desenvolvimento de câncer gástrico em idade precoce na população estudada.

Descritores: neoplasias gástricas; síndromes neoplásicas hereditárias; caderinas; fatores de risco; dieta.

Guindalini RSC. Identification of E-cadherin / *CDH1* germline variants and environmental risk factors in early onset gastric cancer patients [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Abstract

Introduction: Gastric cancer is a multifactorial disease influenced by inherited and noninherited factors. Although hereditary diffuse gastric cancer syndrome caused by germline mutation in *CDH1* is a rare condition its contribution to gastric cancer burden in Brazil, which is considered a high-incidence country for this neoplasia, is unknown.

Objectives: To evaluate the frequency of *CDH1* germline variants and the diet/lifestyle habits in early-onset gastric cancer (EOGC, <55 years old) patients in Brazil.

Methodology: From October 2013 to August 2015, a total of 88 unrelated and consecutive patients attending a Brazilian public hospital with EOGC were enrolled. All *CDH1* exons and intronic boundaries were sequenced. The diet/lifestyle habits of EOGC patients have been compared to Brazilian population databases.

Results: Of 88 patients, 51.1% were female and the mean age at gastric cancer diagnosis was 39 years (range 20-55); 23% reported family history of gastric cancer in first- or second-degree relatives. The majority of the tumors were diffuse (74%), poorly differentiated (74%), and located in the middle and distal-third of the stomach (67%). In total, 24 germline variants were detected: 3 (12.5%) benign, 17 (70.8%) likely benign, and 4 (16.7%) variants of unknown significance (VUS). All VUS were missense novel mutations: c.313T>A, c.387G>T, c.1676G>A, and c.1806C>A. EOGC patients had a higher red (OR: 2.591, 95% CI: 1.371–4.894) and processed (OR: 3.093, 95% CI: 1.591–6.009) meat intake compared to eating habits of the Brazilian population.

Conclusion: To our knowledge, this is the largest series investigating the contribution of *CDH1* germline mutations in EOGC cancer in Latin America. For a high-incidence country, the incidence of *CDH1* germline variants was higher than expected; 4 novel *CDH1* missense mutations were identified and further studies are warranted to confirm their pathogenicity. Modifiable risk factors, such as the consumption of red and/or processed meat may have contributed to early-onset gastric cancer development in our studied population.

Descriptors: stomach neoplasms; neoplastic, syndromes, hereditary; cadherins; risk factors; diet.

Lista de Figuras

Figura 1 – Síndromes de predisposição hereditária ao câncer de estômago.....	17
Figura 2 – Visão esquemática do complexo E-caderina-catenina-citoesqueleto.....	20
Figura 3 – Estado de origem dos probandos brasileiros incluídos no estudo	44

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Número de casos de câncer de estômago por faixa etária segundo ano de diagnóstico no período de 2009 a 2014.....	14
Tabela 2 – Critérios clínicos para o diagnóstico da síndrome de câncer gástrico difuso hereditário – International Gastric Cancer Linkage Consortium (IGCLC).....	22
Tabela 3 – Critérios clínicos para o diagnóstico do Câncer Gástrico Familiar, de acordo com Brooks-Wilson (CGF) ³⁶	23
Tabela 4 – Mutações germinativas no <i>CDH1</i> identificadas na América do Sul em pacientes com câncer gástrico difuso.	25
Tabela 5 – Condições experimentais e as sequências dos oligonucleotídeos usados nos ensaios de PCR e sequenciamento do gene <i>CDH1</i>	35
Tabela 6 – Características clínico-patológicas.....	43
Tabela 7 – Histórico familiar de câncer em 88 pacientes diagnosticados com cancer gástrico ≤ 55 anos.....	45
Tabela 8 – Variantes germinativas identificadas em 88 pacientes diagnosticados com cancer gástrico ≤ 55 anos	47
Tabela 9 – Características clínico-patológicas, história familiar e variantes germinativas dos pacientes com câncer gástrico ≤ 55 anos.	48
Tabela 10 – Análise <i>in silico</i> , análise funcional previamente descrita e pesquisa em bancos de dados das variantes <i>missense</i> germinativas do gene <i>CDH1</i>	55
Tabela 11 – Análise <i>in silico</i> das variantes germinativas do gene <i>CDH1</i> com possível impacto no processo de <i>splicing</i>	57
Tabela 12 – Variantes germinativas de <i>CDH1</i> nunca descritas previamente com potencial patogênico.	59
Tabela 13 – Comparação de fatores de risco para cancer gástrico entre os pacientes selecionados nesse estudo e referências populacionais obtidas em bancos de dados brasileiros.....	61

Sumário

1. Introdução	13
1.1. Epidemiologia	13
1.2. Tipos histológicos e moleculares	14
1.3. Fatores de risco	16
1.4. Predisposição genética e síndromes hereditárias	17
1.5. Síndrome de câncer gástrico difuso hereditário	18
1.5.1. Aspectos gerais e históricos	18
1.5.2. Descrição e funções do gene <i>CDHI</i>	18
1.5.3. Critérios clínicos para rastreamento genético para CGDH	21
1.5.4. Relevância clínica da mutação germinativa em <i>CDHI</i>	24
1.5.5. Manejo clínico para portadores de mutação germinativa em <i>CDHI</i>	24
1.5.6. Mutações patogênicas de <i>CDHI</i> identificadas na América do Sul	25
1.5.7 Mutações patogênicas de <i>CDHI</i> em pacientes jovens com câncer gástrico	26
2. Objetivos	28
2.1. Objetivo Geral	28
2.2. Objetivos Específicos	28
3. Casuística e Métodos	29
3.1. Casuística	29
3.2. Critérios de inclusão do grupo de estudo	30
3.3. Critérios de exclusão	30
3.4. Consulta médica pré-teste e preenchimento de questionário clínico, epidemiológico, familiar e de exposição ambiental	30
3.5. Coleta de sangue periférico	31
3.6. Extração do DNA	31
3.6.1. Separação de Leucócitos do Sangue Periférico	31
3.6.2. Extração de DNA de leucócitos	32
3.7. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	33
3.8. Sequenciamento pelo método de Sanger do gene <i>CDHI</i>	36
3.9. Amplificação Dependente da Ligação de Múltiplas Sondas (MLPA)	36
3.9.1. Desnaturação do DNA e hibridização das sondas	37
3.9.2. Ligação da sonda	38
3.9.3. Reação de PCR	38
3.9.4. Leitura das amostras e análise dos dados	38
3.10. Análise dos resultados do sequenciamento direto	39
3.10.1. Identificação de variantes	39

3.10.2. Nomenclatura	39
4. Resultados	42
4.1. População do estudo	42
4.2. Histórico familiar de câncer	45
4.3. Variantes germinativas de <i>CDH1</i> identificadas no sequenciamento completo e MLPA	46
4.4. Análise <i>in silico</i> das variantes <i>missense</i> do <i>CDH1</i>	53
4.5. Análise <i>in silico</i> do impacto no processo de splicing das variantes no gene <i>CDH1</i>	56
4.6. Variantes germinativas do gene <i>CDH1</i> potencialmente patogênicas	58
4.5. Hábitos alimentares e hábitos de vida	60
5. Discussão	62
6. Conclusões	66
7. Referências	67
8. Anexos	72

1. Introdução

1.1. Epidemiologia

Apesar do declínio da incidência nos últimos anos, o câncer gástrico é ainda o quinto câncer mais comum no mundo. Com base no documento *World Cancer Report 2014* da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) foram estimados 952.000 novos casos (7% da incidência total de câncer) e 723.000 mortes (9% da mortalidade total de câncer) globalmente em 2012¹. Há uma variação internacional de 10 vezes na incidência de câncer de estômago. Mais de 70% dos casos (677.000 casos) ocorrem em países em desenvolvimento (456.000 nos homens, 221.000 em mulheres), sendo as mais altas taxas de incidência observadas em países da Ásia Oriental (42,4 / 100.000), Europa Oriental e Central (21,9 / 100.000), América Central (12,7 / 100.000) e América do Sul (17,3 / 100.000). As taxas mais baixas relatadas ocorrem na América do Norte (5,8 / 100.000) e na África (4,7 / 100.000). Além disso, as taxas nos homens são aproximadamente o dobro daquelas observadas em mulheres².

O câncer de estômago é a terceira principal causa de morte por câncer em ambos os sexos em todo o mundo. A taxa estimada de mortalidade mais elevada ocorre na Ásia Oriental (24 por 100.000 nos homens, 9,8 por 100.000 em mulheres) e a mais baixa, na América do Norte (2,8 e 1,5, respectivamente). Altas taxas de mortalidade também estão presentes em ambos os sexos na Europa Central e Oriental e na América do Sul e Central¹.

Dentro do contexto mundial, o Brasil é considerado um país de taxa de incidência alta de câncer de estômago. No ano de 2016, estimam-se, para o Brasil, 12.920 casos novos de câncer do estômago em homens e 7.600 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 13,04 casos novos a cada 100 mil homens e 7,37 a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do estômago é o quarto mais frequente em homens (6%) e o quinto mais frequente em mulheres (3.7%). Somente no Estado de São Paulo, estimam-se 14,90 casos novos a cada 100 mil homens e 7,87 a cada 100 mil mulheres dessa neoplasia³. Segundo dados do Registro Hospitalar do Câncer da Fundação Oncocentro cerca de 5% dos casos

acontecem em pacientes abaixo de 40 anos e dois terços dos casos em pacientes acima de 55 anos (Tabela 1)⁴. O pico de incidência se dá em sua maioria em homens, por volta dos 70 anos³.

Tabela 1 – Número de casos de câncer de estômago por faixa etária segundo ano de diagnóstico no período de 2009 a 2014.

Ano	Casos Notificados <40 anos (%)	Casos Notificados <55 anos (%)	Casos Notificados em todas as idades
2009	108 (5,2)	687 (33,1)	2.075
2010	107 (5,2)	609 (29,7)	2.052
2011	126 (5,6)	677 (30,1)	2.251
2012	87 (4,3)	555 (27,4)	2.028
2013	93 (5,0)	528 (28,6)	1.845
2014	83 (5,5)	415 (27,4)	1.516
TOTAL	604 (5,1)	3.471 (29,5)	11.767

Fonte: Fundação Oncocentro de São Paulo - Registro Hospitalar de Câncer (acessado em 26-03-2016)

Apesar dos avanços no conhecimento desta neoplasia, o prognóstico ainda é desfavorável uma vez que grande parte dos diagnósticos são realizados tardiamente, ocasionando baixa sobrevida em cinco anos. No Brasil, a sobrevida em cinco anos diminuiu entre os períodos de 1995 a 1999 e 2005 a 2009 (de 33% para 25%)³.

1.2. Tipos histológicos e moleculares

A maioria dos tumores de estômago são carcinomas (95%), que são neoplasias malignas de origem epitelial. Tumores não-epiteliais do estômago incluem predominantemente linfomas e tumores mesenquimais. Carcinomas gástricos representam um grupo biologicamente e

geneticamente heterogêneo de tumores com etiologias multifatoriais, tanto ambientais quanto genéticas. Eles são caracterizados pela ampla heterogeneidade morfológica em relação a padrões de arquitetura e crescimento, diferenciação celular, histogênese e patogênese molecular.

Uma das classificações histológicas mais comumente utilizadas de carcinoma gástrico é a classificação de Laurén⁵, na qual os tipos difuso e intestinal são identificados como os dois principais. Os tipos misto e indeterminado são relativamente raros. O tipo difuso consiste em células tumorais fracamente coesas, apresentando pouca ou nenhuma formação glandular. Por outro lado, o tipo intestinal forma glândulas com vários graus de diferenciação.

A classificação adotada pela Organização Mundial (OMS) da Saúde é uma outra classificação amplamente utilizada e estipulou cinco tipos principais⁶: (1) tubular; (2) papilar; (3) mucinoso; (4) pouco coeso, incluindo carcinoma de células anel de sinete e outras variantes; e (5) misto. Os tipos tubular e papilar na classificação da OMS correspondem aproximadamente ao tipo intestinal na classificação de Laurén e o tipo pouco coeso corresponde ao tipo difuso.

Em 2014, por meio da análise molecular de 295 adenocarcinomas gástricos, o projeto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) propôs uma nova classificação molecular para esta neoplasia⁷. Esta classificação molecular dividiu o câncer gástrico em quatro subtipos: (1) tumores positivos para o vírus Epstein-Barr (EBV) (9%), que apresentam mutações recorrentes em *PIK3CA*, hipermetilação extrema do DNA e amplificação de *JAK2*, *CD274* (também conhecido como PD-L1) e *PDCD1LG2* (também conhecido como PD-L2); (2) tumores com instabilidade de microssatélites (22%), os quais mostram taxas elevadas de mutação, incluindo mutações em genes que codificam proteínas de vias de sinalização oncogênicas com potencial para desenvolvimento de terapia alvo; (3) tumores genomicamente estáveis (20%), que são enriquecidos com a variante histológica difusa (73%) e mutações de *RHOA* ou fusões envolvendo proteínas GTPases ativadoras da família RHO; e (4) tumores com instabilidade cromossômica (50%), que mostram acentuada aneuploidia e amplificações focais de receptores tirosina-quinases.

Em detalhe, o subtipo genomicamente estável é enriquecido para tipo histológico difuso (73%), mutações somáticas em *CDH1* (37%) e *RHOA* (15%) e fusões *CLDN18-ARHGAP* (15%). Além disso, foi evidenciado que os indivíduos com este subtipo eram diagnosticados em idade mais precoce (59 anos)⁷.

1.3. Fatores de risco

A principal causa de câncer gástrico é a infecção crônica por *H. pylori*. A IARC classificou *H. pylori* como um carcinógeno classe I em 1994 e manteve esta classificação em 2009 após a revisão de evidências mais recentes⁸. Acredita-se que cerca de 89% dos casos de câncer gástrico distal em todo o mundo são atribuíveis a infecção crônica pelo *H. pylori*⁹. A prevalência da infecção em adultos varia entre 20% a 50% em países industrializados e mais de 80% em países em desenvolvimento¹⁰.

Um outro agente infeccioso que tem sido associado com o câncer gástrico é o vírus EBV. Estima-se que cerca de 8% dos cânceres gástricos abrigam o EBV, no entanto ainda é insuficiente a evidência epidemiológica para estabelecer um papel etiológico definitivo do EBV na carcinogênese gástrica¹¹.

Vários outros fatores de risco, incluindo idade avançada, sexo masculino, tabagismo, etilismo, status socioeconômico baixo, baixo nível de atividade física e exposição à radiação têm sido associados ao aumento do risco de câncer gástrico em geral, enquanto doença do refluxo gastroesofágico e a obesidade têm sido associados com risco aumentado especificamente para câncer da cárdia^{12,13}.

Fatores dietéticos foram investigados em diversos estudos em relação ao risco de câncer gástrico. Uma revisão sistemática abrangente de fatores dietéticos e prevenção de câncer, publicado pelo *World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research* concluiu que alguns tipos de vegetais e frutas, provavelmente, protegem contra o câncer gástrico, enquanto que o sal e alimentos preservados em sal, são, provavelmente, causadores desta doença^{13,14}.

Parentes de primeiro grau de pacientes diagnosticados com câncer gástrico têm quase 3 vezes mais probabilidade do que a população geral de desenvolver câncer gástrico. Isso pode ser parcialmente atribuível à infecção por *H. pylori*, por esta ser comumente compartilhada pelas famílias. No entanto, predisposição hereditária ao câncer tem o seu papel. Há evidências de agrupamento familiar em cerca de 10% dos casos e cerca de 1-3% dos cânceres gástricos estão vinculados a uma síndrome de predisposição hereditária, das quais o principal tipo é a síndrome de câncer gástrico difuso hereditário¹².

1.4. Predisposição genética e síndromes hereditárias

Cerca de 90% dos cânceres gástricos são esporádicos, porém agregação familiar é observada em aproximadamente 10% dos casos. Neste grupo, 10-30% estão associados a síndromes hereditárias conhecidas. Entre as formas hereditárias, mutações germinativas no gene da E-cadherin tipo 1 (epithelial cadherin, *CDH1*, OMIM# 192090) configuram o mecanismo genético mais importante identificado até o momento. Estas mutações caracterizam a síndrome de câncer gástrico difuso hereditário (CGDH). Outras síndromes que também estão associadas ao aumento de risco para câncer de estômago são: síndrome de Lynch, Li-Fraumeni, Peutz-Jeghers, Cowden, polipose adenomatosa familiar, polipose adenomatosa associada a MYH, polipose juvenil e *gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach* (GAPPS)^{15,16}.

Figura 1 – Síndromes de predisposição hereditária ao câncer de estômago

1.5. Síndrome de câncer gástrico difuso hereditário

1.5.1. Aspectos gerais e históricos

CGDH é uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer autossômica dominante causada por mutações germinativas no gene *CDH1* que codifica a proteína de adesão celular E-caderina. EM 1998, Guilford *et al* identificaram a associação genética entre mutações germinativas no *CDH1* e CGDH em três famílias Maori da Nova Zelândia através de análise de ligação^{17,18}. Desde então, cerca de 155 mutações germinativas no gene *CDH1* já foram publicadas, sendo 81% patogênicas e 19% variantes de significado clínico incerto^{19,20}. Além disso, foram identificadas grandes deleções em cerca de 4% dos casos²¹. Independente do tipo, a maioria (75%) das mutações resultam em proteínas truncadas com perda de função¹⁹ e já foram observadas em várias etnias, como, por exemplo, em descendentes de africanos, asiáticos, europeus, entre outros²⁰.

1.5.2. Descrição e funções do gene *CDH1*

O gene *CDH1* localiza-se no cromossomo 16q22.1 e codifica a proteína supressora de tumor E-caderina tipo 1 (Figura 1), a qual é membro da família das glicoproteínas transmembranas e expressa em tecidos epiteliais. É uma molécula de adesão cálcio-dependente que se localiza nos contatos látero-laterais das células epiteliais e se liga a outras moléculas de E-caderina em células adjacentes, desempenhando importante papel na manutenção da arquitetura e função dos tecidos epiteliais por meio da adesão homofílica intercelular. Os 16 éxons do gene da E-caderina codificam um peptídeo de sinal de 27 aminoácidos (éxons 1 e 2), um peptídeo precursor de 154 aminoácidos (éxons 2 a 4) e uma proteína madura de 728 aminoácidos. A proteína madura apresenta três domínios maiores: (a) grande domínio extracelular (éxons 4 a 13); (b) domínio transmembrana (éxons 13 e 14); (c) domínio citoplasmático (éxons 14 a 16)²².

A função adesiva de E-caderina é dependente da interação do seu domínio citoplasmático com cateninas [β -catenina e γ -catenina (paccoglobina)]. Elas, por sua vez, ligam a caderina via α -catenina com o citoesqueleto de actina. Outra catenina, p120ctn, que foi originalmente identificada como um substrato de Src e vários receptores tirosina-quinase, também interagem com o domínio citoplasmático da E-caderina, mas a sua função ainda não está clara. A fosforilação de β -catenina e p120ctn pode regular a adesão célula-célula através da E-caderina. Em adição ao seu papel importante na adesão célula-célula, a proteína β -catenina está envolvida na via de sinalização Wnt. Neste contexto, o complexo caderina / catenina possui um papel importante durante o desenvolvimento tumoral uma vez que existe uma importante interação entre β -catenina e a proteína supressora de tumor APC²³.

O papel da E-caderina já foi estudado em vários tipos de tumores. Identificou-se que expressão está reduzida em cânceres de pele, cabeça e pescoço, pulmão, mama, tireóide, cólon e ovário²⁴. Em câncer gástrico difuso esporádico e câncer lobular de mama esporádico, perda da expressão de E-caderina está associada com mutações somáticas pontuais, perda de heterozigossidade e/ou hipermetilação do promotor²⁵⁻²⁷. A sequência destes eventos é desconhecida. Na maioria dos carcinomas, a perda da E-caderina é usualmente um evento tardio associado à invasão e metástase. Em CGDH, no entanto, perda de E-caderina é aparentemente precoce, sendo potencialmente um evento inicial²⁸.

Figura 2 – Visão esquemática do complexo E-caderina-catenina-citoesqueleto.

A porção N-terminal dos dímeros de E-caderina estende-se para o espaço intercelular, onde interage com os dímeros de E-caderina como um mecanismo de zíper. Íons cálcio (Ca^{++}) são essenciais para a correta conformação e funcionalidade das caderinas. A porção C-terminal das moléculas de E-caderina estende-se para o citoplasma. Estes domínios associam-se com as cateninas [β -catenina (β) e γ -catenina (pacoglobina), p120]. A β -catenina e a γ -catenina associam-se com a α -catenina (α) que, por sua vez, se conectam aos microfilamentos de actina do citoesqueleto. Adaptado de Aberle et al²⁹ e Berxs et al²³. APC, adenomatous polyposis coli. TCF/Lef1, T-cell factor/lymphocyte-enhancer factor.

Foi demonstrado que a imunoexpressão de E-caderina está reduzida ou ausente em carcinoma gástrico precoce, contrastando com a expressão normal de E-caderina em membranas celulares da mucosa adjacente não-neoplásica³⁰. Em lesões de disseminação pagetóide ou carcinoma *in situ*, a imunoexpressão de E-caderina também se mostrou reduzida ou ausente³¹. Ademais, foi evidenciado que anormalidades de expressão de E-caderina ocorre mais frequentemente em tumor tipo difuso do que em tipo intestinal³². No entanto, deve-se salientar que expressão de E-caderina no tipo difuso não é sempre reduzida ou ausente, dependendo da localização da mutação ou do mecanismo específico de inativação do alelo selvagem. Portanto, imuno-histoquímica para E-caderina não deve ser utilizada como um método de rastreamento para selecionar pacientes elegíveis para análise de mutação germinativa de *CDH1*³³.

1.5.3. Critérios clínicos para rastreamento genético para CGDH

Em 1999, logo após a descoberta do gene responsável pelo CGDH, o *Internacional Gastric Cancer Linkage Consortium* (IGCLC) definiu os critérios clínicos para selecionar famílias candidatas ao teste de rastreamento genético (Tabela 2)³⁴. Utilizando-se esta recomendação, a taxa de detecção variava entre 25 a 50%^{19,35,36}.

Entretanto, após ser evidenciado que famílias com mutações germinativas no *CDH1* também apresentavam agregação familiar de carcinoma lobular de mama e/ou carcinoma de cólon com células em anel de sinete e que pacientes jovens com câncer gástrico difuso sem história familiar também poderiam ser portadores de mutação, Brooks-Wilson *et al* propuseram critérios modificados para caracterizar o câncer gástrico familiar (Tabela 3) em 2004³⁶. Com o acúmulo de conhecimento sobre a síndrome hereditária, destacando-se sua associação com defeitos congênitos de fenda [fissura labial (lábio leporino) e a fenda palatina]^{37,38}, o IGCLC realizou atualizações periódicas do seu consenso sobre critérios clínicos para rastrear CGDH, a primeira em 2010³⁰ e, mais recentemente, em 2015³³ (Tabela 2). Os critérios do último consenso utilizados para identificar candidatos elegíveis para o teste genético são: (a) dois ou mais casos de câncer gástrico na família, sendo pelo menos um caso confirmado de câncer gástrico difuso; (b) um caso de câncer gástrico difuso diagnosticado antes dos 40 anos; (c) história pessoal ou familiar de câncer gástrico difuso e câncer lobular de mama, com pelo menos um caso < 50 anos³³.

Tabela 2 – Critérios clínicos para o diagnóstico da síndrome de câncer gástrico difuso hereditário – International Gastric Cancer Linkage Consortium (IGCLC).

IGCLC 1999³⁴	IGCLC 2010³⁰	IGCLC 2015³³
Critérios estabelecidos^a	Critérios estabelecidos^a	Critérios estabelecidos^a
≥ 2 casos de CGD na família, sendo 1 caso diagnosticado < 50 anos	≥ 2 casos de CG na família, sendo 1 caso CGD diagnosticado < 50 anos	≥ 2 casos de CG na família, sendo pelo menos 1 caso de CGD
≥ 3 casos de CGD na família independente da idade	≥ 3 casos de CGD na família independente da idade	1 caso CGD diagnosticado < 40 anos
	1 caso CGD diagnosticado < 40 anos	história pessoal ou familiar de CGD e CLM, com pelo menos 1 caso diagnosticado < 50 anos
	História pessoal ou familiar de CGD e CLM, com pelo menos 1 caso diagnosticado < 50 anos	
		Famílias nas quais o teste pode ser considerado*
		CLM bilateral ou história familiar de ≥ 2 casos de CLM
		história pessoal ou familiar de fenda labial/palatina em paciente com CGD
		células em anel de sinete in situ e/ou disseminação pagetóide de células em anel de sinete

Símbolos: ^a, incluindo parentes de primeiro grau e segundo grau

Abreviações: CG, câncer gástrico; CGD, câncer gástrico difuso; CLM, câncer lobular de mama.

Tabela 3 – Critérios clínicos para o diagnóstico do Câncer Gástrico Familiar, de acordo com Brooks-Wilson (CGF)³⁶

1	≥ 2 casos de CGD em parentes de primeiro grau, sendo 1 caso diagnosticado < 50 anos
1A	≥ 2 casos de CG, sendo 1 caso de CGD diagnosticado < 50 anos
2	≥ 3 casos confirmados de CGD em parentes de primeiro grau independente da idade
2A	≥ 3 casos confirmados de CG em qualquer idade, sendo pelo menos 1 caso de CGF documentando
3	1 caso CGD diagnosticado < 45 anos
4	1 indivíduo com CGD e CLM
5	1 membro da família diagnosticado com CGD e outro com CLM
6	1 membro da família diagnosticado com CGD e outro com CC
7	Câncer gástrico intestinal

Abreviações: CG, câncer gástrico; CGD, câncer gástrico difuso; CLM, câncer lobular de mama.

1.5.4. Relevância clínica da mutação germinativa em *CDH1*

A penetrância da mutação germinativa no gene *CDH1* é alta. Estudo recente evidenciou risco cumulativo de câncer gástrico até os 80 anos de 70% (IC 95%, 59% -80%) para o sexo masculino e 56% (IC 95%, 44% -69%) para as mulheres, e o risco de câncer de mama para as mulheres de 42% (IC 95%, 23% -68%)²⁰. A alta taxa de penetrância destaca a importância de identificar indivíduos portadores, pois há estratégias de rastreamento e redução de risco de câncer relevantes para o manejo clínico desses pacientes.

1.5.5. Manejo clínico para portadores de mutação germinativa em *CDH1*

Atualmente, o manejo ideal destes pacientes é a realização do teste de rastreamento de mutação no *CDH1* após consentimento, aconselhamento e discussão com equipe multidisciplinar. Além do sequenciamento direto, grandes rearranjos genômicos devem ser procurados. Atualmente, as análises genéticas são principalmente realizadas através da combinação de sequenciamento de Sanger e *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA). Estas técnicas podem ser substituídas por sequenciamento de nova geração, se a abordagem utilizada preencher o requisito semelhante de sensibilidade. Mamografia anual e ressonância magnética de mama a partir da idade de 35 anos é recomendado para mulheres, devido ao risco aumentado para câncer de mama lobular. Em indivíduos positivos para mutação, gastrectomia total profilática em um centro de excelência deve ser fortemente considerada, uma vez que procedimentos endoscópicos isoladamente não são capazes de identificar a grande maioria das lesões precoces do estômago^{33,39}. Vigilância endoscópica protocolada em centros com endoscopistas e patologistas experientes com esta patologia é recomendada para: os que optam por não fazer gastrectomia; aqueles com variantes de significado indeterminado; e as famílias para quem a mutação germinativa não foi identificada ainda. O estudo histológico sistemático de gastrectomias profiláticas quase universalmente evidencia lesões pré-invasivas ou neoplasias, incluindo carcinoma *in situ* anel de sinete com propagação pagetóide de células em anel de sinete³⁹. Confirmação histológica desta lesão precoce é recomendada³¹.

1.5.6. Mutações patogênicas de *CDH1* identificadas na América do Sul

No total, 155 mutações germinativas em *CDH1* foram descritas no mundo, das quais 126 são patogênicas, ou seja, variantes reportadas pelos bancos de dados internacionais e reconhecidas como de efeito deletério, e 29 são variantes de significado incerto, as quais são variantes reportadas pelos bancos de dados internacionais, mas que não apresentam um consenso sobre sua significância clínica até o momento²⁰.

Em 2012, Corso *et al* avaliou a distribuição geográfica de 122 mutações de *CDH1* identificadas até aquele período. A maioria foi identificada em áreas com baixa taxa de incidência de câncer gástrico (87,5%). Em áreas de alta taxa de incidência, foram identificadas 16 mutações, sendo que as mutações *missense* foram predominantes (68,8%)⁴⁰.

A América do Sul é considerada uma região de taxa de incidência alta de câncer de estômago. Poucos trabalhos investigaram a presença de mutações em *CDH1* nessa população e, até o momento, somente 5 mutações germinativas de *CDH1* foram descritas nessa região: 3 *missense* (2 no Brasil⁴¹ e 1 na Colômbia⁴²), 1 *nonsense* (Argentina)⁴³ e 1 *frameshift* (Brasil)⁴⁴ (Tabela 4).

Tabela 4 – Mutações germinativas no *CDH1* identificadas na América do Sul em pacientes com câncer gástrico difuso.

País	c.	p.	Éxon	Tipo	Patogenicidade
Argentina ⁴³	1913 G>A	W638X	12	<i>Nonsense</i>	Patogênica
Brasil ⁴¹	185G>T	G62V	3	<i>Missense</i>	VSI
Brasil ⁴¹	1018A>G	T340A	8	<i>Missense</i>	Patogênica
Brasil ⁴⁴	1763_1764delTG	Val588Glufs*2	12	<i>Frameshift</i>	Patogênica
Colômbia ⁴²	2245C>T	R749W	14	<i>Missense</i>	Patogênica

Abreviação: VSI, variante de significado incerto.

Dispomos de poucos dados nacionais publicados referentes às mutações presentes em nossa população. No Brasil, a determinação de mutações para o gene *CDH1* só é disponível no setor privado, com custo bastante elevado e sem divulgação para a comunidade científica do espectro de mutações encontrado. Além dos estudos citados anteriormente, identificamos apenas uma tese de mestrado sobre CGDH realizada na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) – Cirurgia do Aparelho Digestivo que avaliou o gene *CDH1* em 34 pacientes com câncer de estômago que preenchiam critérios de *Brooks-Wilson*. Neste estudo, não foram utilizadas as técnicas de sequenciamento completo ou MLPA, dificultando a caracterização de um padrão de espectro mutacional populacional, se é que ele existe em nosso meio. Neste trabalho não foram evidenciadas mutações definitivamente patogênicas⁴⁵.

1.5.7 Mutações patogênicas de *CDH1* em pacientes jovens com câncer gástrico

Em geral, mutações germinativas no gene *CDH1* foram identificadas em indivíduos com história familiar positiva para câncer gástrico difuso. No entanto, pouco se conhece sobre a importância da presença de mutações germinativas em *CDH1* na população geral.

Poucos estudos analisaram a frequência mutacional de *CDH1* na população independente do histórico familiar. Bacani *et al* publicaram a maior série ao analisar 81 casos de câncer gástrico diagnosticados em indivíduos abaixo de 50 anos, tendo identificado a presença da mutação em 1.3% destes casos⁴⁶. Após esta publicação, Corso *et al* compilou os dados de todos os estudos que investigaram pacientes jovens com câncer gástrico esporádico. Nesta análise combinada de 264 casos, foram identificadas 19 (7,2%) variantes germinativas em *CDH1*, mas em apenas 2,3% (6/264) dos indivíduos essas variantes de fato representavam mutações com efeito comprovadamente deletério⁴⁷. Deve-se salientar que os pacientes eram predominantemente advindos de regiões com baixas taxas de incidência da doença.

No Brasil, um país considerado de alta taxa de incidência de câncer gástrico, não há estudos populacionais sobre a frequência mutacional de *CDH1* em pacientes diagnosticados em idade precoce com câncer gástrico esporádico. Além disso, não há estudos sobre os fatores de risco conhecidos que podem estar influenciando o aparecimento de câncer em pacientes mais jovens na nossa população. Portanto, a influência de mutações germinativas em *CDH1* sobre a

incidência de câncer gástrico na população brasileira, em especial naqueles pacientes diagnosticados em idade precoce, ainda é desconhecida.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo principal deste estudo é identificar variantes germinativas do gene *CDH1* e fatores de risco em pacientes diagnosticados com carcinoma de estômago até os 55 anos de idade.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste estudo são:

- identificar mutações deletérias germinativas do gene *CDH1* em pacientes diagnosticados com carcinoma de estômago até os 55 anos de idade;
- determinar a frequência de mutações deletérias germinativas do gene *CDH1* em pacientes diagnosticados com carcinoma de estômago até os 55 anos de idade;
- realizar caracterização clínico-patológica, epidemiológica, de hábitos de vida e de exposição a fatores ambientais em pacientes diagnosticados com carcinoma de estômago até os 55 anos de idade.

3. Casuística e Métodos

3.1. Casuística

Foram convidados a participar do estudo os pacientes atendidos no ICESP com mais de 18 anos de idade e que tivessem sido diagnosticados com câncer de estômago até 55 anos de idade, independente do estadio da doença e dos antecedentes familiares. Os critérios de inclusão e exclusão foram criados para enriquecer a população do nosso estudo com pacientes jovens e com diagnóstico de carcinoma do tipo difuso (vide abaixo critérios de inclusão e exclusão).

Este estudo foi inscrito na Plataforma Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP) (Anexo 1). Os pacientes elegíveis respeitando os critérios de exclusão e inclusão assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), coletaram amostra de sangue para pesquisa de mutações germinativas em *CDH1* e responderam ao questionário para avaliar hábitos, condições socioambientais e história familiar (Anexo 3). Aqueles pacientes que dispunham de amostras emblocadas em parafina de tecido tumoral adquiridas por endoscopia ou cirurgia também podiam consentir o uso deste material para o estudo.

Foi realizada uma consulta ambulatorial para obtenção dos dados familiares e orientação do paciente em relação ao teste. Caso indicado, era oferecido suporte psicológico aos pacientes. Pacientes com biópsia de outro serviço eram encorajados a trazer o material para revisão pelo laboratório de patologia do ICESP e depois a disponibilizar parte dele para pesquisa. Era oferecido a todos os pacientes que eventualmente fossem identificados como portadores de mutações germinativas deletérias o seguimento clínico e cuidados clínico-cirúrgicos no Ambulatório de Câncer Hereditário do ICESP. Além disso, era oferecido aconselhamento genético, apoio psicológico e teste genético para os familiares de primeiro e segundo grau dos pacientes portadores de mutações germinativas deletérias. Para os familiares identificados como portadores assintomáticos de mutações deletérias era oferecido seguimento clínico e cuidados clínico-cirúrgicos no Ambulatório de Câncer Hereditário do ICESP.

3.2. Critérios de inclusão do grupo de estudo

Os critérios de inclusão utilizados para esse trabalho foram:

- Idade maior ou igual a 18 anos;
- Diagnóstico do primeiro carcinoma de estômago (difuso/intestinal/misto/indeterminado e/ou pouco diferenciado) até os 40 anos de idade;
- Diagnóstico do primeiro carcinoma de estômago (difuso/misto/indeterminado e/ou pouco diferenciado) entre os 41 e 55 anos;
- Assinatura do TCLE.

3.3. Critérios de exclusão

O critério de exclusão utilizado para esse trabalho foi:

- Carcinoma neuroendócrino de estômago.

3.4. Consulta médica pré-teste e preenchimento de questionário clínico, epidemiológico, familiar e de exposição ambiental

Os pacientes responderam em entrevista conduzida pela equipe da pesquisa a um questionário com questões clínicas, epidemiológicas, familiares e de exposição ambiental que contemplava (Anexo 2):

- dados demográficos - nome, sexo, data de nascimento, naturalidade, procedência atual e remota, procedência dos antepassados, etnia declarada, escolaridade;
- dados clínicos – data(s) do(s) diagnóstico(s) de câncer de estômago, histologia do(s) tumor(es) e imuno-histoquímica, infecção pelo *H. pylori*, estadiamento clínico, estadiamento patológico, tratamentos realizados e/ou propostos, data da recidiva (se houver), data do diagnóstico de outras neoplasias ou lesões pré-neoplásicas (se houver), moléstias concomitantes relevantes, hábitos alimentares e vícios;
- dados familiares – procedência dos antepassados, histórico detalhado de câncer na família (com requisição de cópia do exame de anatomopatológico, quando disponível) e construção de heredograma com três gerações, sempre que possível;
- exposição a fatores ambientais.

3.5. Coleta de sangue periférico

Todos os pacientes coletaram por meio de punção da veia do antebraço 20 ml de sangue periférico em dois tubos com EDTA.

3.6. Extração do DNA

3.6.1. Separação de Leucócitos do Sangue Periférico

Para a separação de leucócitos por lise de eritrócitos, foi adicionado 30 ml da solução Tris-EDTA (TE) pH 8,0 aos 10 ml de sangue de cada paciente, completando 40 ml e agitados por 1 minuto. Após a agitação, a amostra foi centrifugada por 7 minutos a 1100 rpm, utilizando a

centrífuga da marca *Eppendorf (Hamburg, Germany)*, modelo 5415D ou 5804R. Foi descartado o sobrenadante, restando no todo 5 ml da solução e precipitado. Uma nova agitação foi realizada por 10 segundos e após esta agitação, foi adicionado TE pH 8,0, completando o volume para 30 ml. Após a agitação por 1 minuto, a amostra foi centrifugada por 7 minutos a 1100 rpm. Novamente foi descartado o sobrenadante restando 5 ml da solução e precipitado. Estes foram agitados por 10 segundos e divididos em 5 alíquotas, contendo 1 ml cada. Por fim, foi centrifugado por 1 minuto a 12000 rpm e descartado o sobrenadante. Caso a extração de DNA não fosse realizada logo após a separação de leucócitos do sangue, as células eram armazenadas em freezer a -70°C até o uso.

3.6.2. Extração de DNA de leucócitos

Para análise de mutações germinativas foi utilizado DNA extraído de células mononucleares obtidas do sangue periférico. Essa extração foi realizada por meio da utilização do Kit Extração de DNA BioPUR (Biometrix Diagnósticos, Curitiba, Paraná, Brasil) que se baseia na lise de membrana celular. Após descongelar as amostras, foram adicionados 900 µl da solução de lise celular e homogeneizadas gentilmente por inversão; após a homogeneização, as amostras foram deixadas em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 20 segundos a 13000 rpm, utilizando a centrífuga da marca *Eppendorf (Hamburg, Germany)*, modelo 5415D ou 5804R. Foi descartado o sobrenadante, restando cerca de 20 µl da solução anterior, o tubo foi agitado por 10 a 20 segundos e foram adicionados 300 µl de tampão de lise nuclear. Após 1 hora a 37°C, foi acrescentado 1,5 µl de RNases para digerir o RNA em solução, a qual foi homogeneizada por inversão e deixada a 37°C por 15 minutos, e em seguida a temperatura ambiente por 10 minutos ou até esfriar. Foram acrescentados 100 µl de tampão de precipitação de proteínas e após a agitação por 10 a 20 segundos, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 300 µl de isopropanol. A amostra foi homogeneizada por inversão até formar um agregado visível (DNA). Após a centrifugação por 1 minuto a 13000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e adicionado 500 a 700 µl de etanol 70%. Foi feita a homogeneização por inversão e logo em seguida a centrifugação a 13000 rpm por 1 minuto. Foi descartado o sobrenadante, e o

tubo foi deixado a temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período, foram adicionados 100 µl de solução de reidratação. A concentração e a pureza do DNA foram determinadas pela leitura da absorbância a 260 e 280 nm por espectrofotometria. As amostras foram mantidas a 65°C por 1 hora para uso imediato, caso contrário, deixadas a 4°C por 16 horas e posteriormente armazenadas em freezer a -20°C.

3.6.3. Determinação da concentração de DNA

Após a extração do DNA, sua concentração foi obtida pela leitura da absorbância a 260 e 280 nm por espectrofotometria no equipamento *Nanodrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). O mesmo processo era utilizado para avaliar a pureza da amostra em relação a proteínas (relação 260/280 nm deverá estar em torno de 1,8) e reagente utilizados no processo de extração do DNA (relação 260/230 nm deverá estar entre 1,8 e 2,2).

3.7. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para sequenciamento de todos os 16 éxons do gene *CDH1* foi necessária inicialmente a realização da PCR. Foram utilizados os reagentes: tampão para *AmpliTaQ Gold 1X*; cloreto de magnésio para *AmpliTaQ Gold®* ($MgCl_2$, concentração variando de 1,5 mM a 3 mM, de acordo com o fragmento que era amplificado); enzima *AmpliTaQ Gold®* 250U a 0,4U/µl. Todos os reagentes fazem parte do *AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase with Gold Buffer and $MgCl_2$* - Número do Catálogo: 4311814 (Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA); deoxinucleotídeos (dNTPs) a 0,16 mM; oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso a 0,4 mM cada e DNA a 50 ng. O volume da reação foi completado com água ultrapura livre de RNases/DNases para o volume final de 10 µl.

A reação foi realizada em aparelho termociclador *GeneAmp® PCR Systems 9700* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) e submetida à variação de

temperatura. A reação foi submetida a: 94°C por 4 minutos (ativação da enzima); 35 ciclos: 94°C por 30 segundos (desnaturação das fitas), 50-70°C por 40 segundos (anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores – as temperaturas ideais para cada éxons eram padronizadas de acordo com as bandas apresentadas), 72°C por 50 segundos (extensão da fita pela ação da enzima); 72°C por 3 minutos (extensão final da fita) e 4°C por tempo indeterminado (final da reação).

Uma alíquota do produto (4 µl) foi avaliada qualitativamente por eletroforese em gel de agarose diluída a 1,5% em Tris-Borato-EDTA 1X (TBE) e corado com GelRed (Uniscience, São Paulo, Brasil – Número do Catálogo: 41003). Após a visualização da banda única e sem rastros (reação específica), o produto da PCR foi purificado utilizando *illustra™ ExoStar™* 1-Step (GE Healthcare Life Sciences, *Buckinghamshire, UK* – Número do Catálogo: 35079049), no qual foram adicionados 2 µl de ExoStar em cada produto de PCR e colocado em termociclador *Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems, *Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA*) a 37°C por 15 minutos e posteriormente 80°C por 15 minutos. A fosfatase alcalina e exonuclease 1 contidas neste reagente removem resíduos e partículas não incorporadas na reação de PCR. Todas as amostras foram armazenadas em freezer (-20 °C) até o sequenciamento.

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores de cada éxons do gene *CDH1* estão a uma distância de 50 a 100 pares de bases de cada éxons. Isto permite que toda a área de interesse seja rastreada, inclusive regiões intrônicas próximas aos éxons, onde eventuais alterações podem ser importantes por estarem localizadas em sítios de splicing. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para as sequências do gene *CDH1* estão descritos na Tabela 5⁴⁸.

Tabela 5 – Condições experimentais e as sequências dos oligonucleotídeos usados nos ensaios de PCR e sequenciamento do gene *CDH1*

Posição	Direção	Sequência dos oligos iniciadores (5' – 3')	Produto (pb)	[MgCl ₂]	Temperatura anelamento
Éxon 1	Senso Anti-senso	TACGGGGGGCGGTGCCTCCGGGG CCGCAAGCTCCGCGCCCCAG	282	2 mM ^a	70 °C
Éxon 2	Senso Anti-senso	TGTTGGTTTCGGTGAGCAG ' GGTGTGGGAGTGCAATTTCT 3'	261	2 mM	54 °C
Éxon 3	Senso Anti-senso	CGCTCTTTGGAGAAGGAATG AACGGTACCAAGGCTGAGAA	376	2 mM	55 °C
Exon4-5	Senso Anti-senso	TGTACACTGCCACAGAAGG GTTACCCCGGTGTCAACAAG	574	2 mM	55,8 °C
Éxon 6	Senso Anti-senso	GCCCCTTCTCCCATGTTT' CTTTGGGCTTGGACAACACT	287	3 mM	60 °C
Éxon 7	Senso Anti-senso	GGGCAGAATTGGATTAAGCA TGTCACGGGATTGAGCTA	320	2 mM	53 °C
Éxon 8	Senso Anti-senso	CTGGGCTAGGCCAAAGGT CCATGAGCAGTGGTGACACTT	272	2 mM	55,8 °C
Éxon 9	Senso Anti-senso	AATCCTTTAGCCCCCTGAGA ' AGGGGACAAGGGTATGAACA	326	2 mM	54 °C
Éxon 10	Senso Anti-senso	CCAAAAGCAACAGTTAAGGA CAAATGACAAAATGCCATGA	433	2 mM	50 °C
Éxon 11	Senso Anti-senso	AGCGCTTAAGCCGTTTTCA GAGGGGCAAGGAACTGAACT	283	2 mM	54 °C
Éxon 12	Senso Anti-senso	AAGGCAATGGGGATTCTTA ' ATTGAAAGGTGGGGATCTGG	363	3 mM	60 °C
Éxon 13	Senso Anti-senso	CAATTTTATTCTGGAATGAGCTTTT CAGGAAATAAACCTCCTCATT	363	2 mM	50 °C
Éxon 14	Senso Anti-senso	GCTGCTTCTGGCCTTCTTTA GCTGTTTCAAATGCCTACCTCT	281	2 mM	55 °C
Éxon 15	Senso Anti-senso	TGAACATAGCCCTGTGTGTATG TTTTTGACACAACCTCCTCTG	281	2 mM	53 °C
Éxon 16	Senso Anti-senso	AGACTTCTGCCCCAGATGA AACCACCAGCAACGTGATT	347	2 mM	54 °C

Símbolos: ^a, adição de DMSO 5%.

3.8. Sequenciamento pelo método de Sanger do gene *CDH1*

Uma nova reação de PCR da amostra de DNA amplificado foi preparada. Nesta etapa utilizamos um oligonucleotídeo (senso e anti-senso) para cada reação. Foram utilizados os reagentes: *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA – Número do Catálogo: 43374456); *BigDye® Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA – Número do Catálogo: 4336697); oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso a 10 mM (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA*) e 1 µl do produto da PCR. O volume da reação foi completado com água ultrapura livre de RNAses/DNAses para volume final de 10 µl em placa de 96 wells. A reação foi levada ao termociclador *Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) e submetida a: 96°C por 1 minuto (desnaturação), 35 ciclos com variação de temperatura: 96°C por 15 segundos (anelamento), 50°C por 15 segundos (extensão) e 60°C por 4 minutos (extensão da final) e a 4°C por tempo indeterminado.

A próxima etapa consistiu na purificação do produto do sequenciamento. Para tal, foi utilizado o *Big Dye XTerminator® kit* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA - Número do Catálogo: 4376487), onde foram adicionados a cada produto do sequenciamento 45µl de *SAM Solution* e 10µl *Exterminator Solution*, em seguida, a placa foi agitada a 1.500rpm por 30 minutos (aparelho MS3 digital – IKA, São Paulo, Brasil – Número do Catálogo: 0003319000). O produto dessa reação foi analisado no aparelho de sequenciamento automático ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA).

3.9. Amplificação Dependente da Ligação de Múltiplas Sondas (MLPA)

Para os pacientes sem mutação deletéria no sequenciamento pelo método de Sanger, analisamos, por MLPA, grandes inserções ou deleções no gene *CDH1*. Para isso, utilizamos os kits: *SALSA® MLPA® P083-C2 CDH1 probemix* da MRC-Holland (Amsterdam, Holland). O kit consiste na utilização de sondas compostas de dois oligonucleotídeos (A e B) localizados muito próximos e

complementares a uma sequência alvo no gene. Além desta região de hibridização, as sondas possuem regiões complementares a um par de oligonucleotídeos iniciadores marcados com o fluoróforo FAM (estes oligonucleotídeos marcados são os mesmos para todas as sondas de todos os kits oferecidos pela MRC Holland, podendo variar o fluoróforo) e uma sequência *stuffer*, que é diferente para cada sonda e caracteriza os fragmentos amplificados por tamanho. Quando as sequências alvo estão presentes na amostra, os oligonucleotídeos A e B se hibridizam para posteriormente serem conectados pela enzima Ligase-65. Somente as sondas já ligadas são amplificadas por PCR, cada uma gerando um produto de tamanho único (130 a 409 pb). Diferenças nos valores relativos referentes à amplificação são expressos em tamanhos ou áreas diferentes entre amostras de pacientes e de controles negativos (amostras de sangue de indivíduos controles sem o diagnóstico de câncer).

Além dos controles externos, cada kit contém seus controles internos (sondas que hibridizam a regiões cromossômicas diferentes) e controles de quantidade e desnaturação do DNA: *Q-fragments* e *D-fragments*, respectivamente. Os *Q-fragments* estão presentes em todos os kits de MLPA e são quatro fragmentos (64, 70, 76 e 82 nt) que não dependem da ligação de sondas. Quando seus picos estão maiores que a metade do tamanho dos picos dos *D-fragments* e das sondas de MLPA, isso indica uma quantidade de DNA insuficiente ou falha na reação. Os *D-fragments*, presentes na maioria dos kits, são três sondas dependentes de ligação (88, 92 e 96 nt) como qualquer outra do kit de MLPA; sendo assim, seus picos devem ser de tamanho semelhante ao das outras sondas do kit, indicando que o DNA foi devidamente desnaturado e houve ligação das sondas.

3.9.1. Desnaturação do DNA e hibridização das sondas

Em tubos de 0,2 µL, foram adicionados 80 ng de DNA em um volume de 2,5 µL completados com água ultra pura. Em seguida, as amostras foram colocadas em termociclador *Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA*) a 98°C por 15 minutos, para desnaturação do DNA, e depois resfriadas a 25°C antes de abrir o termociclador. Foram adicionados 0,75 µL de sonda MLPA e 0,75 µL de MLPA buffer e incubados a 95°C por 1 minuto, seguida de um hold a 60°C por 17 horas.

3.9.2. Ligação da sonda

A temperatura foi reduzida para 54°C antes de abrir o termociclador. Em cada amostra foram adicionados 16 µL de *Mix Ligas*'' (1,5 µL de ligase buffer A; 1,5 µL de ligase buffer B; 0,5 µL de Ligase-65 e 12,5 µL de água estéril). Em seguida as amostras com o mix foram incubadas a 54°C por 15 minutos, 98°C por 5 minutos e resfriadas a 20°C.

3.9.3. Reação de PCR

Foi preparado o *Mix Polimerase* (1 µL de Salsa PCR primers; 0,25 µL de Salsa polimerase e 3,75 µL de água estéril), adicionados 5 µL em cada amostra, as quais foram incubadas a 95°C por 1 minuto. Em seguida, esta reação foi submetida à variação de temperatura por 35 ciclos: 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos; 72°C por 20 minutos e mantidas a 15°C. Em seguida, foram armazenadas a 4°C ao abrigo da luz.

3.9.4. Leitura das amostras e análise dos dados

Inicialmente, o produto da PCR foi diluído em uma proporção de 1:10, ou seja, 1 µL de produto em 9 µL de água. Em seguida, foi preparado um mix: 9 µL *Hi-Di™ Formamide* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA* – Número do Catálogo: 4440753) e 0,075 µL de *GeneScan™ 600 LIZ® dye Size Standard v2.0* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA* - Número do Catálogo: 4408399) e adicionado 1 µL de produto da PCR diluído. Esta reação foi incubada a 80°C por dois minutos. A placa com as amostras foi analisada no aparelho de sequenciamento automático *Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA*). A análise dos resultados foi realizada utilizando o software *Coffalyser.NET*, específico para reações de MLPA e disponível gratuitamente pela empresa MRC-Holland.

3.10. Análise dos resultados do sequenciamento direto

3.10.1. Identificação de variantes

Os picos de fluorescência adquiridos no sequenciamento foram analisados por meio do programa CHROMAS (www.technelysium.com.au/chromas.html). As sequências obtidas foram analisadas pelos programas *Mutation Surveyor version 3.20* (SoftGenetics LLC, State College, PA, USA) e comparadas com a sequência referência do gene descrita no *GenBank* (NM_004360.4).

3.10.2. Nomenclatura

A nomenclatura da mutação do DNA baseia-se na sequência de cDNA do gene *CDH1* (*GenBank*, NM_004360.4). O sistema de nomenclatura para a descrição das alterações no DNA, RNA e proteínas seguiu as recomendações da *Human Genome Variation Society* (<http://www.hgvs.org/>), com numeração a partir da primeira posição do códon inicial de tradução.

3.10.3. Análise *in silico* de patogenicidade das variantes

Uma variedade de ferramentas *in silico*, tanto públicas quanto comercialmente disponíveis, pode ajudar na interpretação de variantes. Os algoritmos utilizados por cada uma das ferramentas podem variar, determinando, por exemplo, o efeito da variante sobre nucleotídeos e aminoácidos, incluindo a determinação do efeito da variante sobre os transcritos principal do gene e transcritos alternativos, outros elementos genômicos, bem como o impacto potencial da variante na proteína. As duas principais categorias de tais ferramentas incluem aquelas capazes de prever que uma mudança *missense* é prejudicial para a função ou para a estrutura da proteína resultante e aquelas que preveem a existência de um efeito sobre o *splicing*. Foram utilizados quatro diferentes algoritmos de previsão de patogenicidade de variantes de *splicing*:

- *Human Splicing Finder* (HSF, v 3.3, <http://www.umd.be/HSF3/>)⁴⁹;
- Preditor de *splicing* da Neural Network (NNS, v0.9, http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)⁵⁰;
- *MaxEntScan* (MES, http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html)⁵¹;
- NetGene2 (NG2, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>)⁵².

Estes algoritmos utilizam diferentes modelos para avaliar o efeito da variante no *splicing*, exceto por NNSplice e NetGene2 que baseiam-se em *neural networks*⁵³.

Foram utilizados cinco diferentes algoritmos de previsão de patogenicidade de variantes *missense*:

- Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT, v1.0.3, <http://sift.jcvi.org>)⁵⁴;
- Align GVGD (http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php)^{55,56};
- MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org>);
- Protein Variation Effect Analyzer (Provean, v1.1, <http://provean.jcvi.org/index.php>)⁵⁷;
- Polymorphism Phenotyping (Poly-Phen, v2.2.2, (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>)⁵⁸.

SIFT interpreta o efeito da variante com base na conservação evolutiva, isto é, na homologia da sequência, em que resíduos em posições importantes para a função da proteína devem estar conservados em um alinhamento de proteínas. Align GVGD, Mutation Taster e PolyPhen, consideram além da conservação evolutiva, a estrutura e função da proteína. PROVEAN

considera o alinhamento e mensuração de similaridade entre sequência variante e sequência de proteína homóloga⁵³.

3.10.4. Banco de dados de variantes

Todas as variantes identificadas foram consultadas em bancos de dados em relação a sua frequência populacional e sua patogenicidade. O *Exome Aggregation Consortium* (ExAC) (<http://exac.broadinstitute.org>) foi consultado para frequência populacional; este banco de dados abriga um conjunto de dados de 60.706 indivíduos não aparentados sequenciados como parte de vários estudos de doenças específicas e de estudos de genética de populações. Uma vez que não há disponível na literatura bancos de dados populacionais brasileiros, foram utilizadas as frequências alélicas publicadas em um recente estudo brasileiro de Brito *et al.* Neste estudo, foram utilizados dados genéticos de 609 controles brasileiros⁵⁹.

Os bancos de dados *ClinVar*⁶⁰ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) e *Leiden Open Variation Database*⁶¹ (<http://www.lovd.nl>) que contêm variantes de doenças específicas, foram consultados para acessar a patogenicidade conferida às variantes.

As variantes encontradas foram classificadas conforme critérios do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG)⁵³.

3.10.5. Análise de hábitos alimentares e de hábitos de vida

Para comparar o padrão de hábitos alimentares e de hábitos de vida entre os pacientes jovens com câncer gástrico e a padrão da população brasileira foi utilizado o cálculo de razão de chances (em inglês: *odds ratio*; abreviatura OR). Os valores de referência para o grupo controle utilizados foram extraídos dos bancos de dados da população brasileira do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)⁶², Sistema de Vigilância Alimentar Nutricional (SISVAN)⁶³ e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas (INPAD)⁶⁴. A

população controle avaliada foi variável, chegando a 50.000 pessoas no caso de questionário dietético aplicado pelo IBGE.

4. Resultados

4.1. População do estudo

De outubro de 2013 a agosto de 2015, 93 pacientes consecutivos e não aparentados diagnosticados com câncer gástrico abaixo de 55 anos foram incluídos. Entretanto, 2 pacientes não tiveram sucesso na coleta de sangue e 3 deles foram excluídos do estudo por alteração do diagnóstico anatomopatológico, após revisão de lâminas da biópsia tumoral no ICESP (2 tumores neuroendócrinos e 1 não foi confirmado neoplasia de estômago na amostra).

As características dos 88 pacientes do estudo estão descritas na Tabela 6. A idade média ao diagnóstico foi de 39 anos. Os pacientes eram oriundos de todas as regiões brasileiras, sendo que a maioria era natural da região Sudeste (50%) e Nordeste (38.6%). Não houve diferença entre sexos (Figura 3). A maioria dos pacientes foi diagnosticada com doença localmente avançada (27.3%) ou metastática (39.8%), com tumores pouco diferenciados (74%), do tipo difuso (74%) e localizados em corpo/antro (67%). Mais da metade submeteram-se à gastrectomia (58%) e cerca de 28% tratados inicialmente com intenção curativa, apresentaram recidiva tumoral. A infecção por *H. pylori* pode ser confirmada em 6%, sendo que em 64%, a ocorrência da infecção não pode ser determinada.

Tabela 6 – Características clínico-patológicas

Características clínico-patológicas (n=88)	
Idade média ao diagnóstico (anos, intervalo)	39 (20 a 55)
Sexo	
Feminino	45 (51,1%)
Masculino	43 (48,9%)
Região de origem	
Norte	4.6%
Nordeste	38.6%
Centro-oeste	2.3%
Sudeste	50.0%
Sul	3.4%
Estrangeiro	1.1%
Estadio inicial (%)	
I	14 (15.9%)
II	14 (15.9%)
III	24 (27.3%)
IV	35 (39.8%)
Desconhecido	1 (1.1%)
Localização	
TEG	16 (18%)
Fundo	1 (1%)
Corpo	31 (35%)
Antro/piloro	28 (32%)
Desconhecido	12 (14%)
Tipo de Láuren	
Difuso	65 (74%)
Intestinal	4 (4%)
Misto	6 (7%)
Outros/desconhecidos	13 (15%)
Grau de diferenciação	
pouco diferenciado	70 (80%)
moderadamente diferenciado	4 (4%)
bem diferenciado	1 (1%)
Desconhecido	13 (15%)
<i>H. pylori</i>	
Sim	6 (7%)
Não	26 (29%)
Desconhecido	56 (64%)
Gastrectomia	
Sim	51 (58%)
Não	37 (42%)
Recidiva	
Sim	15/53 (28%)
Não	38/53 (72%)

Figura 3 – Estado de origem dos probandos brasileiros incluídos no estudo

4.2. Histórico familiar de câncer

O histórico familiar de câncer dos participantes do estudo está descrito na Tabela 7. Apesar de todos os pacientes com câncer gástrico difuso abaixo de 40 anos terem indicação de realizar a pesquisa de mutação germinativa no gene *CDH1*, desde a atualização das diretrizes do IGCLC em 2010, nenhum preenchia os critérios clássicos postulados em 1999. Apesar dos casos índices possuírem parentes de primeiro e/ou segundo grau com câncer gástrico diagnosticados abaixo (8%) e acima (15%) de 50 anos, a obrigatoriedade da confirmação do tipo histológico difuso do parente dificulta a inclusão neste critério. No nosso estudo, nenhum paciente conseguiu confirmar o tipo histológico do parente.

Pouco mais da metade (55%) dos pacientes preenchiam os critérios do IGCLC 2010 e 2015, sendo que 47% preenchiam estes critérios devido ao diagnóstico de câncer gástrico difuso abaixo dos 40 anos.

Neste grupo de pacientes, 8% dos probandos possuíam familiares de 1º ou 2º graus com diagnóstico de câncer de mama, no entanto a informação sobre o tipo histológico (lobular ou não-lobular) não era disponível. Portanto, o histórico de câncer de mama na família não pode ser considerado para avaliar preenchimento de critérios clínicos do IGCLC atualizados.

Tabela 7 – Histórico familiar de câncer em 88 pacientes diagnosticados com cancer gástrico ≤ 55 anos

Histórico familiar de câncer (n=88)	
Parente 1º ou 2º grau câncer gástrico < 50a	7 (8%)
Parente 1º ou 2º grau câncer gástrico > 50a	13 (15%)
Parente 1º ou 2º grau câncer de mama < 50a	6 (7%)
Parente 1º ou 2º grau câncer de mama > 50a	1 (1%)
Critérios clássicos IGCLC (1999)	0 (0%)
Critérios atualizados IGCLC (2010)	48 (55%)
Critérios atualizados IGCLC (2015)	48 (55%)
Critérios Câncer Gástrico Familiar	59 (67%)

4.3. Variantes germinativas de *CDH1* identificadas no sequenciamento completo e MLPA

O sequenciamento completo do gene *CDH1* foi realizado em todos os pacientes. Os resultados estão descritos na Tabela 8. Foram identificadas 24 variantes, sendo 5 (20.8%) missense, 6 (25%) sinônimas e 13 (54.2%) intrônicas. Foram identificadas 8 variantes com frequência populacional maior que 1% pelo ExAC, sendo, com isso, consideradas polimorfismos: c.48+6C>T, c.531+10G>C, c.1896C>T, c.1937-13T>C, c.2076T>C, c.2164+16insA, c.2253C>T e c.2634C>T. Dentre os polimorfismos identificados, 3 deles (c.48+6C>T, c.1937-13T>C e c.2076T>C) apresentam o critério “*Stand-alone BA1*” do ACMG que os classificam como variantes benignas, pois possuem frequência alélica > 5%. Após extensa busca na literatura e consulta aos bancos de dados *Clinvar* e *LOVD*, foram identificadas 9 variantes nunca reportadas na literatura: c.49-61T>G, c.163+57G>A, c.163+59G>C, c.313T>A, c.387G>T, c.1676G>A, c.1806C>A, c.2164+16insA e c.2439+56T>G.

MLPA foi realizado em 18 pacientes do estudo. Não foram encontradas grandes deleções ou inserções.

Excluindo-se os 8 polimorfismos, 32 pacientes apresentaram variantes germinativas (independente de sua patogenicidade) em *CDH1*, totalizando 36.4% dos casos (Tabela 9).

Tabela 8 – Variantes germinativas identificadas em 88 pacientes diagnosticados com cancer gástrico ≤ 55 anos

Localização	Posição genômica	HGVS c.	HGVS p.	Tipo	n	dbSNP	AF Probandos	AF ExAC	AF Bras	Classificação
Intron 1	Chr16:68.771.372	c.48+6C>T		I	78	rs3743674	0.443	0.811	ND	B – P
Intron 1	Chr16:68.772.141 ^a	c.49-59G>T		I	9	ND	0.051	0.000	ND	PB
Intron 2	Chr16:68.772.369 ^a	c.163+57G>A		I	16	ND	0.0909	ND	ND	PB
Intron 2	Chr16:68.772.371 ^a	c.163+59G>C		I	5	ND	0.02840	ND	ND	PB
Exon 3	Chr16:68.835.722 ^a	c.313T>A	S105T	M	1	ND	0.0057	0.000	ND	VSI
Exon 3	Chr16:68.835.733	c.324A>G	R108R	S	1	rs116542018	0.0057	0.001038	0.0049	PB
Exon 3	Chr16:68.835.754	c.345G>A	T115T	S	1	rs1801023	0.0057	0.004	0.005	PB
Exon 3	Chr16:68.835.796 ^a	c.387G>T	Q129H	M	1	ND	0.0057	0.00001	ND	VSI
Intron 3	Chr16:68.835.823	c.387+27C>T		I	1	rs33932809	0.0057	0.001159	0.0041	PB
Intron 3	Chr16:68.842.283	c.388-44G>A		I	1	rs368884824	0.0057	0.000396	ND	PB
Intron 4	Chr16:68.842.480	c.531+10G>C		I	4	rs33963999	0.023	0.038	0.029	PB – P
Intron 4	Chr16:68.842.578	c.532-18C>T		I	1	rs200673941	0.0057	0.003	0.003	PB
Intron 6	Chr16:68.845.571	c.833-16C>G		I	2	rs33984587	0.011	0.001	0.004	PB
Exon 11	Chr16:68.853.293 ^a	c.1676G>A	S559N	M	1	ND	0.0057	0.000	ND	VSI
Exon 12	Chr16:68.855.998 ^a	c.1806C>A	F602L	M	1	ND	0.0057	0.000	ND	VSI
Exon 12	Chr16:68.856.041	c.1849G>A	A617T	M	4	rs33935154	0.023	0.004	0.007	PB
Exon 12	Chr16:68.856.088	c.1896C>T	H632H	S	7	rs33969373	0.040	0.011	0.039	PB – P
Intron 12	Chr16:68.857.289	c.1937-13T>C		I	13	rs2276330	0.074	0.105	0.075	B – P
Exon 13	Chr16:68.857.441	c.2076T>C	A692A	S	78	rs1801552	0.443	0.655	0.344	B – P
Intron 13	Chr16:68.857.544 ^a	c.2164+16insA		I	6	rs34939176	0.034	0.045	ND	PB – P
Exon 14	Chr16:68.862.165	c.2253C>T	N751N	S	8	rs33964119	0.045	0.040	0.038	PB – P
Intron 15	Chr16:68.863.710	c.2439+10C>T		I	1	rs35236080	0.0057	0.001	ND	PB
Intron 15	Chr16:68.863.756 ^a	c.2439+56T>G		I	3	ND	0.017	0.000	ND	PB
Exon 16	Chr16:68.867.387	c.2634C>T	G878G	S	4	rs2229044	0.023	0.009631	0.03	PB – P

Abreviações: AF, *allele frequency*; B, benigna; B – P, benigna e polimorfismo; Chr, *chromosomes*; Classif, classificação; dbSNP, Single Nucleotide Polymorphism Database; ExAC, Exome Aggregation Consortium; HGVS, Human Genome Variation Society; I, *intronic variant*; M, *missense*; S, *synonymous*; AF Bras; frequência alélica de variantes reportadas em 609 controles brasileiros do estudo Brito LA et al (2015)⁵⁹; ND, não disponível; PB, provavelmente benigna; VSI, variante de significado clínico incerto.

Símbolos: ^a, variante não descrita previamente.

Tabela 9 – Características clínico-patológicas, história familiar e variantes germinativas dos pacientes com câncer gástrico ≤ 55 anos.

Prob	Id	EC	TH	GD	HF+ CG	HF+ CM	Variantes							
GH-01-01	32,9	IB	outros	pouco	não	não	163+57G>A (B)	2076T>C (P)						
GH-02-01	40,8	IA	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	1937-13T>C (P)	2076T>C (P)					
GH-04-01	35,9	IIIA	dif	pouco	sim	não	48+6C>T (P)	163+57G>A (B)	1849G>A (PB)	2076T>C (P)				
GH-07-01	31	IA	dif	pouco	sim	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)						
GH-12-01	45	IIIC	dif	pouco	não	não	1676G>A (VSI)	2076T>C (P)						
GH-14-01	40,5	IIIC	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	49-59G>T (B)	163+57G>A (B)	163+59G>C (B)	388-44G>A (PB)	1937-13T>C (P)	2076T>C (P)	2164+16insA (P)
GH-15-01	36	IIIC	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	163+57G>A (B)	163+59G>C (B)	2076T>C (P)				
GH-16-01	42,4	IV	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	163+57G>A (B)	163+59G>C (B)	2076T>C (P)				
GH-17-01	37,2	IIB	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)	2164+16insA (P)	2253C>T (P)				
GH-18-01	31	IIIA	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	833-16C>G (PB)	2076T>C (P)					
GH-19-01	39,7	IV	outros	pouco	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)						
GH-20-01	49,7	IA	outros	pouco	sim	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)	2439+10C>T (PB)					
GH-21-01	31,7	IIA	dif	ND	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)						
GH-23-01	31	IA	dif	ND	não	não	48+6C>T (P)							
GH-24-01	32,5	IIA	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)						
GH-25-01	38,6	IV	dif	pouco	não	sim	48+6C>T (P)	1806C>A (VSI)	2076T>C (P)					
GH-26-01	33,3	IV	intest	mod	sim	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)						
GH-27-01	40,8	IV	intest	mod	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)	2164+16insA (P)	2253C>T (P)				
GH-28-01	33,6	IV	dif	pouco	não	sim	1896C>T (P)	2076T>C (P)	2634C>T (P)					
GH-30-01	55	IIA	dif	pouco	não	não	49-59G>T (B)	163+57G>A (B)	2076T>C (P)					
GH-31-01	43,3	IV	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	1849G>A (PB)	2076T>C (	P)				

Prob	Id	EC	TH	GD	HF+ CG	HF+ CM	Variantes				
GH-32-01	48	IIB	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	1849G>A (PB)	2076T>C (P)		
GH-33-01	50,1	IA	dif	pouco	sim	sim	2076T>C (P)				
GH-34-01	27,5	IV	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)			
GH-35-01	38	IV	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)			
GH-36-01	46,9	IIB	misto	ND	não	não	48+6C>T (P)				
GH-37-01	25,3	IV	outros	pouco	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)			
GH-38-01	32,7	IIIA	dif	ND	não	não	2076T>C (P)				
GH-39-01	28,4	IV	dif	pouco	sim	não	48+6C>T (P)	833-16C>G (PB)	1896C>T (P)	2076T>C (P)	
GH-40-01	48,2	IIIC	dif	pouco	não	sim	48+6C>T (P)	2076T>C (P)			
GH-42-01	30,2	IIB	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)			
GH-43-01	47,6	IV	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)			
GH-44-01	25,8	IV	dif	ND	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)			
GH-45-01	21,2	ND	dif	pouco	não	não	163+57G>A (B)	163+59G>C (B)	1937-13T>C (P)	2076T>C (P)	
GH-46-01	34,7	IIIC	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	531+10G>C (P)	2076T>C (P)		
GH-47-01	37,5	IIIA	dif	ND	sim	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)			
GH-48-01	42,4	IIIC	dif	pouco	sim	não	2076T>C (P)	2164+16insA (P)	2253C>T (P)		
GH-49-01	42,5	IB	dif	pouco	não	sim	48+6C>T (P)	2076T>C (P)	2164+16insA (P)	2253C>T (P)	
GH-50-01	42,2	IIIA	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)			
GH-51-01	44,1	IA	dif	ND	sim	não	48+6C>T (P)	1896C>T (P)	2076T>C (P)	2634C>T (P)	
GH-52-01	48,5	IIB	dif	pouco	sim	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)			
GH-53-01	38,5	IIIB	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	49-59G>T (B)	1937-13T>C (P)	2076T>C (P)	2439+56T>G (B)
GH-54-01	34,6	IIA	misto	pouco	não	não	48+6C>T (P)	49-59G>T (B)	2076T>C (P)	2439+56T>G (B)	

Prob	Id	EC	TH	GD	HF+ CG	HF+ CM	Variantes			
GH-55-01	42,7	IIB	dif	bem	não	não	48+6C>T (P)	387+27C>T (PB)	2076T>C (P)	
GH-56-01	31,6	IV	dif	pouco	sim	sim	48+6C>T (P)	1849G>A (PB)	1937-13T>C (P)	2076T>C (P)
GH-58-01	28,2	IA	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)		
GH-59-01	34,3	IIIB	misto	pouco	sim	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)		
GH-60-01	36,2	IV	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)			
GH-61-01	44,7	IB	misto	pouco	sim	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)		
GH-62-01	36,4	IV	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	49-59G>T (B)		
GH-63-01	51,6	IIIB	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)		
GH-64-01	38,9	IV	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	1937-13T>C (P)	2076T>C (P)	
GH-65-01	28,3	IV	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	531+10G>C (P)	2076T>C (P)	
GH-67-01	55,6	IIIC	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	345G>A (B)	2076T>C (P)	
GH-68-01	54,4	IV	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	387G>T (VSI)		
GH-70-01	40,7	IIIA	outros	mod	não	não	48+6C>T (P)			
GH-72-01	51,5	IIB	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	324G>A (PB)	1896C>T (P)	2076T>C (P) 2634C>T (P)
GH-73-01	55,9	IV	dif	ND	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)		
GH-74-01	36,7	IV	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)	2253C>T (P)	
GH-75-01	37,2	IIB	outros	mod	não	não	48+6C>T (P)	1896C>T (P)	2076T>C (P)	
GH-76-01	38,9	IIIB	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	49-59G>T (B)	163+57G>A (B)	2076T>C (P)
GH-77-01	45,2	IV	outros	ND	sim	não	48+6C>T (P)	163+57G>A (B)		
GH-78-01	31,5	IV	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	1937-13T>C (P)	2076T>C (P)	
GH-79-01	41,5	IV	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	1937-13T>C (P)	2076T>C (P)	
GH-80-01	36,4	IIIB	intest	pouco	não	não	48+6C>T (P)	163+57G>A (B)	2439+56T>G (PB)	

Prob	Id	EC	TH	GD	HF+ CG	HF+ CM	Variantes					
GH-81-01	39,4	IIIA	dif	pouco	sim	sim	48+6C>T (P)	49-59G>T (B)	163+57G>A (B)	1896C>T (P)	2076T>C (P)	2634C>T (P)
GH-85-01	42,8	IIIB	outros	pouco	não	não	48+6C>T (P)	1937-13T>C (P)	2076T>C (P)			
S-GAST-101	41,1	IIIC	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)				
S-GAST-108	53,4	IIA	intest	pouco	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)				
S-GAST-109	41,6	IB	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	532-18C>T (PB)	1937-13T>C (P)	2076T>C (P)		
S-GAST-114	55,5	IA	misto	pouco	não	não	48+6C>T (P)					
S-GAST-116	50	IA	dif	pouco	não	não	2076T>C (P)					
S-GAST-124	47,5	IIIB	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	1937-13T>C (P)	2076T>C (P)	2253C>T (P)		
S-GAST-135	48,5	IIB	misto	pouco	não	não	531+10G>C (P)	2076T>C (P)				
S-GAST-143	45,8	IA	outros	pouco	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)				
S-GAST-144	35,4	IV	dif	pouco	sim	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)				
S-GAST-145	37,6	IV	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)				
S-GAST-146	39,6	IIIB	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	163+57G>A (B)	2076T>C (P)			
S-GAST-147	36,5	IV	dif	ND	não	não	48+6C>T (P)	163+57G>A (B)	531+10G>C (P)	2076T>C (P)		
S-GAST-148	39,2	IV	outros	pouco	não	não	48+6C>T (P)	49-59G>T (B)	163+57G>A (B)	2076T>C (P)	2253C>T (P)	
S-GAST-149	37,4	IV	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	163+57G>A (B)	2076T>C (P)			
S-GAST-150	38,2	IV	dif	ND	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)				
S-GAST-151	23,8	IV	outros	ND	sim	não	48+6C>T (P)	49-59G>T (B)	163+57G>A (B)			

Prob	Id	EC	TH	GD	HF+ CG	HF+ CM	Variantes				
S-GAST-152	27,7	IV	outros	pouco	não	não	48+6C>T (P)	163+57G>A (B)	163+59G>C (B)	313T>A (VSI)	2076T>C (P)
S-GAST-153	39,7	IV	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	1937-13T>C (P)	2076T>C (P)		
S-GAST-154	22,8	IV	dif	pouco	não	não	48+6C>T (P)	1937-13T>C (P)	2076T>C (P)		
S-GAST-155	36,7	IIIA	dif	pouco	sim	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)	2164+16insA (P)	2253C>T (P)	
S-GAST-156	20	IV	outros	ND	não	não	48+6C>T (P)	2076T>C (P)			
Abreviações: B, benigna; CG, câncer gástrico; CM, câncer de mama; EC, estadio clínico; GH, grau histológico; HF+, história familiar positiva - parentes de primeiro ou segundo grau com câncer; Id, idade ao diagnóstico; P, polimorfismo; PB, provavelmente benigna; VSI, variante de significado clínico incerto.											

4.4. Análise *in silico* das variantes *missense* do *CDH1*

No total, 5 variantes *missense* foram identificadas, sendo 4 delas nunca reportadas previamente: c.313T>A, c.387G>T, c.1676G>A e c.1806C>A.

As análises *in silico* realizadas por 5 diferentes algoritmos revelaram resultados conflituosos. Todas foram consideradas benignas pelos algoritmos *SIFT*, *PROVEAN* e *PolyPhen-2*. Por outro lado, o *Mutation Taster* considerou todas as variantes como potenciais causadoras de doença. Nenhuma variante atingiu o escore máximo de patogenicidade pelo software *Align-GV/GD*, porém as variantes c.313T>A, c.387G>T e c.1676G>A atingiram escores elevados (Tabela 10). Estes resultados demonstram a fragilidade das análises *in silico* e justificam a recomendação de diretrizes internacionais que preconizam não utilizar esses algoritmos na prática clínica para nortear condutas médicas.

A variante c.1849G>A foi a única já reportada previamente. Ela foi identificada em 4 pacientes no nosso estudo: 4 mulheres com câncer gástrico difuso diagnosticadas aos 31, 35, 43 e 48 anos. Esta variante foi inicialmente descrita como uma mutação patogênica somática em uma paciente com câncer de endométrio⁶⁵ e como uma mutação patogênica germinativa em 1 paciente diagnosticado com câncer gástrico difuso⁶⁶. Esta variante ocorre na porção extracelular da E-caderina que afeta uma sequência conservada codificante de um dos sítios de ligação de cálcio⁶⁷. Estes sítios de ligação de cálcio são importantes, pois estabilizam a conformação ativa da proteína. Devido sua posição, acreditava-se que esta mutação poderia levar a um complexo proteico intercelular instável. Em 2003, Suriano *et al* identificaram esta mutação germinativa em duas pacientes afro-americanas do sexo feminino diagnosticadas com câncer gástrico difuso aos 43 anos⁶⁸. Neste estudo, análises funcionais *in vitro* da variante c.1849G>A foram realizadas. Ensaio de invasão e de fechamento de ferida utilizando células com a variante c.1849G>A não resultaram em comportamento patogênico; enquanto que ensaios de agregação apresentaram somente um retardo moderado de agregação. Os autores concluíram que esta mutação resultou apenas em alterações funcionais leves e, portanto, não podiam de forma conclusiva determinar a sua patogenicidade. Um estudo recente identificou a mesma variante em 6% (10/165) de pacientes afro-americanas diagnosticadas com carcinoma ductal ou misto de mama⁶⁹. Esta frequência foi semelhante à frequência alélica identificada na população africana descrita no ExAC

(0.04622 - 481/10406, sendo 15 aparições em homozigose; <http://exac.broadinstitute.org/variant/16-68856041-G-A>). Na população brasileira, foi demonstrado em um estudo anterior que esta mutação possui frequência alélica de 0.0066⁵⁹. Portanto, devido aos resultados dos ensaios funcionais que não comprometeram significativamente a função celular e sua alta frequência em população afrodescendente, essa variante provavelmente não representa uma variante patogênica.

Tabela 10 – Análise *in silico*, análise funcional previamente descrita e pesquisa em bancos de dados das variantes *missense* germinativas do gene *CDH1*.

Variantes	PolyPhen-2 (0 - 1)	SIFT (0 - 1)	Mutation Taster (prob)	PROVEAN (-13 - 4)	Align- GV/GD (C0-C65)	Análise funcional	ClinVar	LOVD
c.313T>A (p.S105T)	Benigna (0.035)	Tolerada (0.41)	Causadora de doença (-58)	Neutra 250 (-0.80)	C55	ND	ND	ND
c.387G>T (p.Q129H)	Benigna (0.000)	Tolerada (0.36)	Causadora de doença (-24)	Neutra 250 (0.05)	C15	ND	ND	ND
c.1676G>A (p.S559N)	Benigna (0.000)	Tolerada -1	Causadora de doença (-46)	Neutra 250 (1.94)	C45	ND	ND	ND
c.1806C>A (p.F602L)	Benigna (0.140)	Tolerada (0.2)	Causadora de doença (-22)	Neutra 250 (0.07)	C15	ND	ND	ND
c.1849G>A (p.A617T)	Benigna (0.040)	Tolerada (0.19)	Causadora de doença (-58)	Neutra 250 (-0.72)	C55	Alteração leve ⁶⁸	Interpretação conflituosa	+/-

Os significados da amplitude de variações das pontuações são informados de acordo com os nomes dos programas. Previsões categóricas com base nos seguintes valores de corte: PolyPhen-2: Provavelmente danosa se $\geq 0,9$; SIFT: danosa se $\leq 0,05$; PROVEAN: deletéria se $\leq -2,5$; Aling GV/GD: provavelmente benigna quanto mais próximo de C0 e provavelmente deletéria quanto mais próximo de C65; o resultado de Mutation Taster é dado como "polimorfismo" ou "causadora de doença" - um "valor de probabilidade" (prob) indica a segurança da predição, sendo 1 a mais segura.

Interpretação conflituosa: há 9 submissões no Clinvar, sendo 7 considerando a variante benigna e 2 considerando a variante patogênica.

Abreviações: LOVD, Leiden Open Variation Database; ND, não disponível; PolyPhen-2, Polymorphism Phenotyping v2; PROVEAN, Protein Variation Effect Analyzer; SIFT, Sorting Intolerant from Tolerant.

Símbolos: +/-, o responsável por depositar a variante no LOVD indica que ela afeta função, porém o curador do LOVD não classificou essa variante como patogênica.

4.5. Análise *in silico* do impacto no processo de *splicing* das variantes no gene *CDH1*

Entre as variantes analisadas, 5 já foram descritas previamente como benignas e as análises *in silico* realmente indicam seu baixo potencial de patogenicidade: c.324A>G, c.345G>A, c.532-18C>T, c.833-16C>G e c.2439+10C>T. Apenas 1 variante nunca reportada anteriormente apresentou potencial para alterar o processo de *splicing* por pelo menos 2 algoritmos: c.387G>T. Esta variante c.387G>T localiza-se no último nucleotídeo do éxons 3 e provoca a alteração do aminoácido glutamina para histidina. Devido ao seu posicionamento e os resultados que indicam alteração significativa no *splicing* por 3 algoritmos diferentes, esta variante tem potencial para ser uma variante patogênica.

Tabela 11 – Análise *in silico* das variantes germinativas do gene *CDH1* com possível impacto no processo de *splicing*

Exon	Variante	HSF 3.0	MaxEnt	NNSplice	NetGene2	Clinvar	LOVD
		0 – 100 (Δ%)	-20 – 20 (Δ%)	0 – 1 (Δ%)	0 – 1 (Δ%)	(nº entradas)	
Intron 1	c.49-59G>T	89.94 → 79.07 (-12.09%)	3.46 → 5.91 (+70.81%)	=	0.43 → 0.44 (+2.3%)	ND	ND
Intron 2	c.163+57G>A	=	SR	=	0.43 → 0.44 (+2.3%)	ND	ND
Intron 2	c.163+59G>C	=	SR	=	0.37 → 0.36 (-2.7%)	ND	ND
Exon 3	c.313T>A (p.S105T)	89.8 → 85.88 (-4.37%)	5.61 → 2.66 (-52.58%)	=	0.28 → 0.25 (-10.71%)	ND	ND
Exon 3	c.324A>G (p.R108R)	89.8 → 92.92 (+3.49%)	5.61 → 6.86 (+22.28%)	=	0.79 → 0.82 (+3.79%)	Benigna (2) Prov benigna (1)	ND
Exon 3	c.345G>A (p.T115T)	69.5 → 69.1 (-0.58%)	SR	=	0.79 → 0.66 (-16.45%)	Benigna (3)	ED
Exon 3	c.387G>T (p.Q129H)	88.42 → 59.47 (-32.74%)	8.87 → 0.28 (-96.84%)	0.98 → 0.53 (-45.92%)	=	ND	ND
Intron 3	c.387+27C>T	=	5.02 → 4.94 (-1.59%)	0.77 → 0.83 (+7.79%)	0.79 → 0.76 (-3.79%)	ND	ED
Intron 3	c.388-44C>T	=	SR	=	0.54 → 0.56 (+3.7%)	ND	ED
Intron 4	c.532-18C>T	=	10.59 → 10.98 (+3.68%)	=	=	Benigna (2) Prov Benigna (1)	ED
Intron 6	c.833-16C>G	=	8.1 → 7.8 (-3.7%)	0.88 → 0.74 (-15.90%)	0.30 → 0.25 (-16.67%)	Benigna (1) Prov Benigna (1)	ED
Exon 11	c.1676G>A (p.S559N)	74.28 → 45.34 (-38.96%)	SR	=	0.27 → 0.25 (-7.40%)	ND	ND
Exon 12	c.1806C>A (p.F602L)	79.72 → 77.14 (-3.24%)	SR	=	0.25 → 0.19 (-24,00%)	ND	ND
Intron 15	c.2439+10C>T	67.5 → 68.75 (+1.85%)	SR	=	=	Benigna (2) Prov Benigna (1)	ED
Intron 15	c.2439+56T>G	66.32 → 70.62 (+6.48%)	-2.35 → 6.14 (+361.28%)	0.99 → 0.99 0%	0,92 → 0,91 (-1.09%)	ND	ND

O significado da amplitude de variações das pontuações é informado de acordo com os nomes dos programas. HSF 3.0: local de splicing se> = 65 (alteração no sítio de splicing se variação entre selvagem e mutante> 30%); MaxEntScan: local de splicing se> = 3 (alteração no sítio de splicing se variação entre selvagem e mutante> 10%); NNSplice: local de splicing se> = 0,95 (alteração no sítio de splicing se variação entre selvagem e mutante> 10%). Os valores indicados no lado esquerdo e no lado direito da seta referem-se, respectivamente, aos alelos selvagens e mutados. Os valores em destaque referem-se aos valores que ultrapassaram o valor de referência para significância.

Abreviações: ED, efeito desconhecido; prov, provavelmente; ND, não disponível; SR, sem resultado.

Símbolos: =, sem alteração entre selvagem e mutante.

4.6. Variantes germinativas do gene *CDH1* potencialmente patogênicas

Após avaliação da frequência alélica, publicações científicas (com ou sem ensaios funcionais), pesquisa em bancos de dados específicos e utilização de algoritmos *in silico* de predição de patogenicidade, 4 variantes foram classificadas como variantes de significado clínico incerto conforme recomendações do ACMG⁵³ (Tabela 12). Estas variantes foram identificadas em pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico do tipo difuso, sem histórico familiar de câncer gástrico e nunca tinham sido descritas previamente. Portanto, as variantes c.313T>A, c.387G>T, c.1676G>A e c.1806C>A são potencialmente patogênicas. Vale ressaltar que alguns destes pacientes também apresentavam fatores de risco ambientais para câncer de estômago, como infecção por *H. pylori*, etilismo, obesidade, tabagismo e excesso de consumo de carne processada e carne vermelha. Além disso, todos os tumores apresentaram imuno-histoquímica positiva para E-caderina. No entanto, estes achados não excluem a possibilidade de mutações germinativas no gene *CDH1* terem influenciando o aparecimento de tumores nestes pacientes.

Tabela 12 – Variantes germinativas de *CDH1* nunca descritas previamente com potencial patogênico.

Prob	Variante	Sexo	Idade	TH	EC	Fatores genético-moleculares					Fatores socioambientais					
						<i>In Silico</i>	IHQ CDH1	HF	AF ExAC	Hp	Tab	Etil	Carne verm	Carne proc	Frutas	IMC
GH-152-01	c.313T>A (p.S105T)	M	27,7	AGD	IV	danosa	+ ^a	não	ND	+	sim	sim	6-7x/ sem	6-7x/ sem	3-5x/ sem	22.8
GH-68-01	c.387G>T (p.Q129H)	M	54,4	AGD	IV	danosa	+ ^a	Pai, 88a CP	0.0000083	ND	sim	sim	3-5x/ sem	1-2x/ sem	6-7x/ sem	40.9
GH-12-01	c.1676G>A (p.S559N)	F	45	AGD	IIIC	danosa	+ ^b	Irmã, 33a CR	ND	ND	sim	não	1-2x/ sem	<1x/ sem	1-2x/ sem	26.6
GH-25-01	c.1806C>A (p.F602L)	F	38,6	AGD	IV	danosa	+ ^a	Avó, 50a CM	ND	ND	não	Sim	3-5x/ sem	<1x/ sem	6-7x/ sem	31.2

Análise *in silico* – considerada danosa caso pelo menos 2 algoritmos (*Human Splicing Finder*, *Neural Network*, *MaxEntScan*, *NetGene2*, *SIFT*, *Align GV/GD*, *MutationTaster*, *PROVEAN* e *Poly-Phen2*) tenham indicado potencial patogênico.

Abreviações: AGD, adenocarcinoma gástrico do tipo difuso; AF, frequência alélica; avó p, avó paterna; CM, câncer de mama; CP, câncer de próstata; Etil, etilismo; ExAC, Exome Aggregation Consortium; F, feminino; HF, história familiar; HP, *Helicobacter pylori*; IHQ, imuno-histoquímica; IMC, maior índice de massa corpórea antes do diagnóstico do câncer; M, masculino; ND, não disponível; poc, processada; S, sexo; Tab, tabagismo; TH, tipo histológico; verm, vermelha; *In Silico*, Resultado da Análise *In Silico*.

Símbolos: ^a, exame de IHQ realizado em fragmento de carcinomatose peritoneal; ^b, exame de IHQ realizado em tumor gástrico; +, positivo.

4.5. Hábitos alimentares e hábitos de vida

Os hábitos alimentares e de vida praticados pelos pacientes jovens diagnosticados com câncer gástrico neste estudo foram confrontados com bancos de dados representativos dos hábitos alimentares e de vida da população brasileira (IBGE, INPAD e SISVAN). Observou-se que os pacientes apresentavam maior consumo de carne processada (OR=3,093, 95%IC: 1.591 – 6.009; p=0,034), carne vermelha (OR=2.591, 95%IC: 1.371 – 4.894; p 0,003) e de frutas (OR=0,426, 95% IC: 0.271 – 0.668; p<0,001). Além disso, foi observado uma tendência ao maior consumo de comida preservada em sal (OR=1.739, 95%IC: 0.991 – 3.050; p=0,051).

Tabela 13 – Comparação de fatores de risco para cancer gástrico entre os pacientes selecionados nesse estudo e referências populacionais obtidas em bancos de dados brasileiros.

Fatores	Exposição	OR	95% IC	P	Fontes de dados
Tabagismo	Presente	1.485	0.951 – 2.319	0.080	IBGE ⁶²
Álcool	Últimos 6 meses	1.667	0.916 – 3.033	0.094	INPAD ⁶⁴
Frutas	<1x/semana	0.391	0.123 – 1.239	0.098	SISVAN ⁶³
	≤2x/semana	0.684	0.407 – 1.146	0.146	
	≤5x/semana	0.426	0.271 – 0.668	<0.001 ^a	
Folhas	<1x/semana	1.022	0.491 – 2.124	0.954	SISVAN ⁶³
	≤2x/semana	1.136	0.719 – 1.796	0.584	
	≤5x/semana	0.695	0.445 – 1.086	0.108	
Comida preservada em sal	≥1x/semana	1.003	0.627 – 1.601	0.991	SISVAN ⁶³
	≥3x/semana	1.092	0.686 – 1.736	0.709	
	≥6x/semana	1.739	0.991 – 3.050	0.051	
Carne processada	≥1x/semana	0.952	0.612 – 1.481	0.827	SISVAN ⁶³
	≥3x/semana	1.692	1.035 – 2.765	0.034 ^a	
	≥6x/semana	3.093	1.591 – 6.009	<0.001 ^a	
Carne vermelha	≥1x/semana	2.053	0.388 – 10.871	0.389	IBGE ⁶²
	≥3x/semana	1.249	0.635 – 2.452	0.519	
	≥6x/semana	2.591	1.371 – 4.894	0.003 ^a	

Abreviações: IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; IC, intervalo de confiança; INPAD, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas; OR, odds ratio; SISVAN, Sistema de Vigilância Alimentar Nutricional.

Símbolos: ^a, significância estatística.

5. Discussão

O câncer gástrico é um dos maiores causadores de mortalidade por câncer em países em desenvolvimento, no entanto estudos direcionados para avaliar a influência de fatores hereditários sobre esta neoplasia são escassos, principalmente nos países abaixo da linha do Equador. O presente estudo representa a maior série da América Latina que avaliou a incidência e o espectro de mutações germinativas do gene *CDH1* em pacientes consecutivos e não aparentados, diagnosticados com câncer de estômago abaixo dos 55 anos. Foram identificadas 24 variantes, sendo 9 nunca descritas na literatura previamente. Apesar de nenhuma variante definitivamente patogênica ter sido evidenciada, identificou-se 4 mutações do tipo *missense* potencialmente patogênicas.

A população estudada incluiu predominantemente pacientes abaixo de 40 anos, com câncer gástrico do tipo difuso e sem histórico familiar de câncer. Além disso, destacou-se a presença de probandos de todas as regiões brasileiras. Cerca da metade dos participantes eram naturais de estados fora da região Sudeste, sendo 38.6% naturais da região Nordeste. Portanto, apesar do recrutamento ter sido realizado em um único centro universitário da cidade de São Paulo, a população estudada não se limitou somente aos habitantes desta parte do Brasil.

No total, excluindo-se as 8 variantes classificadas como polimorfismos, variantes germinativas de *CDH1* independente de sua patogenicidade ocorreram em 36.4% dos pacientes jovens diagnosticados com câncer gástrico. Esta frequência é maior quando comparada à frequência de 7.2% identificada em estudo de revisão que compilou todas as séries publicadas, em sua maioria oriundas de regiões de baixa incidência de câncer gástrico, com populações de perfil etário e perfil histológico semelhantes. Vale ressaltar que neste estudo de revisão, assim como no nosso estudo, nem todas as variantes descritas eram consideradas definitivamente patogênicas; refinando sua análise, os autores concluíram que em apenas 2.3% dos casos diagnosticados abaixo de 35 anos foram identificadas mutações patogênicas⁴⁷.

Portanto, a ausência ou baixa incidência de mutações definitivamente patogênicas no nosso estudo era esperada, principalmente por ter sido realizado em uma região de alta incidência de câncer gástrico, onde a exposição a fatores de risco externos predomina, aumentando, com isso, o risco de aparecimento de casos esporádicos.

Corso *et al* evidenciaram que o rastreamento genético de *CDH1* realizado em regiões de alta incidência de câncer gástrico identificou variantes germinativas com menor frequência, sendo sua maioria mutações missense (68.8%)⁴⁰. Considerando o Brasil um país com taxa de incidência alta para câncer de estômago, os achados deste estudo divergem, pois além da alta frequência de variantes identificadas, apenas 20.8% são missense.

Dentre as 24 variantes identificadas, 12.5% (3/24) foram classificadas como benignas (2 intrônicas e 1 sinônimas), 70.8% (17/24) como provavelmente benignas (11 intrônicas, 5 sinônima e 1 *missense*) e 16.7% (4/24) como variantes de significado clínico incerto (4 *missense*). Todas as variantes de significado clínico incerto nunca foram descritas previamente na literatura, possuem baixa frequência ou não existem em bancos de dados populacionais e proporcionam um grande desafio para classificação quanto a sua patogenicidade, já que são mutações *missense*.

Hansford *et al* catalogaram recentemente todas as mutações de *CDH1* identificadas até o momento. Dentre as 155 mutações descritas, 126 eram patogênicas e 29 eram variantes de significado clínico incerto. Dentre as 126 patogênicas, somente 16% eram do tipo *missense*. Por outro lado, dentre as 29 variantes de significado incerto, 86% eram do tipo *missense*²⁰. Este levantamento traz à tona a dificuldade enfrentada por todos os grupos de pesquisa em relação à classificação da patogenicidade das mutações *missense*. Apesar de inúmeros algoritmos *in silico* existirem para auxiliar nesta árdua tarefa de classificação dessas variantes, seus resultados usualmente são conflituosos e não devem ser utilizados isoladamente para determinar a patogenicidade de mutações *missense*. De modo geral, são necessários estudos funcionais para confirmar a perda de função da proteína.

Em 2003, tendo em vista a habilidade da proteína E-caderina de mediar a adesão intercelular e suprimir a invasão celular, o grupo da Universidade do Porto desenvolveu um modelo celular para realização de ensaios funcionais *in vitro*. Este modelo utilizou células ovarianas de hamsters chineses e permitiu a determinação do

impacto das variantes missense de *CDH1* em ensaios de agregação e invasão celular, assim como ensaios que avaliavam cicatrização de feridas^{68,70}. A utilização deste modelo associado às informações de estudos de segregação e análise de frequência populacional permitiu a classificação adequada de várias mutações *missense* identificadas^{42,71,72}. Infelizmente, este modelo não é facilmente reproduzível. Seria necessário o desenvolvimento deste *know-how* para realização da análise das variantes identificadas no nosso estudo.

Todos os portadores das 4 variantes de significado clínico incerto identificadas no nosso estudo foram diagnosticados com adenocarcinoma gástrico do tipo difuso em idade precoce. No entanto, não possuem histórias familiares enriquecidas com casos de câncer de estômago e de mama que permitam a realização de estudos de segregação relevantes. Todas as variantes são novas, ou seja, nunca foram previamente publicadas ou reportadas no *Clinvar* e/ou *LOVD*. Dentre as 4 variantes, a c.387G>T possui frequência alélica extremamente baixa (1/119896 alelos; <http://exac.broadinstitute.org/variant/16-68835796-G-T>) e as outras 3 não foram descritas no ExAC. Todas elas encontram-se em éxons nos quais mutações patogênicas foram identificadas previamente. Portanto, a classificação definitiva da patogenicidade dessas variantes será possível somente por meio da realização de ensaios funcionais ou estudos de outras famílias com as mesmas variantes e com suspeita para síndrome de câncer gástrico difuso hereditário.

A análise dos fatores de risco socioambientais, como hábitos alimentares e hábitos de vida, identificou que os pacientes com câncer de estômago em idade precoce apresentavam significativamente um maior consumo de carne processada e carne vermelha e uma tendência ao maior consumo de comida preservada em sal. Este padrão de consumo alimentar está associado com diagnóstico de câncer gástrico, podendo, com isso, ter influenciado o aparecimento desta neoplasia nos casos deste estudo¹³.

Em conjunto, o estudo da influência de fatores germinativos e de fatores externos em 88 pacientes jovens diagnosticados com câncer de estômago no Brasil revelou uma frequência de incidência de mutações germinativas em *CDH1* acima da esperada e um padrão de consumo alimentar preocupante. Em relação aos fatores germinativos, destaca-se a dificuldade de classificação da patogenicidade de variantes

do tipo *missense*, principalmente em genes ainda pouco estudados como o *CDH1*. Além disso, deve-se ressaltar que este estudo se limitou a explorar a presença de variantes germinativas somente no gene *CDH1*. Apesar deste gene ser o mais relevante dentro da síndrome de câncer gástrico difuso hereditário, justificando cerca de 40% dos casos, outros genes podem estar envolvidos no câncer gástrico familiar. Recentemente, novos genes candidatos foram identificados, como o *MAP3K6*⁷³ e o *CTNNA1*⁷⁴, porém a relevância clínica desses achados ainda requer validação. Por fim, observou-se que os hábitos alimentares dos nossos pacientes estão inadequados. Para neoplasias como o câncer gástrico, na qual a influência de fatores externos como alimentação é determinante para o aumento do seu risco, esta informação é relevante. Alertas para a população sobre fatores de risco modificáveis como o padrão de consumo alimentar com a intenção de redução de risco de câncer gástrico devem ser encorajados.

6. Conclusões

A investigação da presença de variantes germinativas do gene *CDH1* e fatores de risco para carcinoma de estômago realizada em 88 pacientes consecutivos e não aparentados diagnosticados até os 55 anos de idade representa a maior série da América Latina – região de alta incidência de câncer gástrico – disponível na literatura até o momento. Foram identificadas 24 variantes, sendo 8 polimorfismos e 4 mutações do tipo *missense* potencialmente patogênicas. A frequência das variantes germinativas de *CDH1* independente de sua patogenicidade observada nesse estudo é superior à relatada em trabalhos anteriores envolvendo pacientes jovens diagnosticados com câncer gástrico. Além disso, foi observado que pacientes diagnosticados em idade precoce relatam um maior consumo de carne processada e carne vermelha em relação a referências populacionais brasileiras.

7. Referências

1. Carneiro FB, Yung-Jue; Hattori, Takanori; Montgomery, Elizabeth A. Stomach cancer: International Agency for Cancer Research, WHO; 2014.
2. Park JY, von Karsa L, Herrero R. Prevention strategies for gastric cancer: a global perspective. *Clinical endoscopy* 2014;47:478-89.
3. da Silva JAG. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>: Instituto Nacional do Câncer - Ministério da Saúde; 2016.
4. FOSP. Registro de Câncer de Base Populacional de São Paulo. <http://200.144.1.68/cgi-bin/dh?rhc/rhc-geral.def>: Fundação Oncocentro de São Paulo; 2015.
5. Lauren P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* 1965;64:31-49.
6. Lauwers GYC, F.; Graham, D. Y.; Curado, M. P.; Franceschi, S.; Montgomery, E.; Tatematsu, M.; Hattori, T. Gastric carcinoma. In: Bosman FTC, F.; Hruban, R. H.; Theise, N. D., ed. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. 4th ed: International Agency for Research on Cancer; 2010:48-58.
7. Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014;513:202-9.
8. *Helicobacter pylori*. In: Group IW, ed. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans - Biological agents*: International Agency for Research on Cancer; 2012:385–436.
9. Plummer M, Franceschi S, Vignat J, Forman D, de Martel C. Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer* 2015;136:487-90.
10. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002;347:1175-86.
11. Camargo MC, Murphy G, Koriyama C, et al. Determinants of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: an international pooled analysis. *Br J Cancer* 2011;105:38-43.
12. Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23:700-13.
13. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. wcrf.org/stomach-cancer-2016. 2016.
14. Cohen AJ, Roe FJ. Evaluation of the aetiological role of dietary salt exposure in gastric and other cancers in humans. *Food Chem Toxicol* 1997;35:271-93.
15. Vogelaar IP, van der Post RS, Bisseling TM, van Krieken JH, Ligtenberg MJ, Hoogerbrugge N. Familial gastric cancer: detection of a hereditary cause helps to understand its etiology. *Hered Cancer Clin Pract* 2012;10:18.
16. Li J, Woods SL, Healey S, et al. Point Mutations in Exon 1B of APC Reveal Gastric Adenocarcinoma and Proximal Polyposis of the Stomach as a Familial Adenomatous Polyposis Variant. *American journal of human genetics* 2016;98:830-42.

17. Guilford PJ, Hopkins JB, Grady WM, et al. E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. *Hum Mutat* 1999;14:249-55.
18. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 1998;392:402-5.
19. Blair V, Martin I, Shaw D, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: diagnosis and management. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2006;4:262-75.
20. Hansford S, Kaurah P, Li-Chang H, et al. Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. *JAMA Oncology* 2015;1:23-32.
21. Oliveira C, Senz J, Kaurah P, et al. Germline CDH1 deletions in hereditary diffuse gastric cancer families. *Human Molecular Genetics* 2009;18:1545-55.
22. Berx G, Staes K, van Hengel J, et al. Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics* 1995;26:281-9.
23. Berx G, Becker KF, Hofler H, van Roy F. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat* 1998;12:226-37.
24. Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *The British journal of surgery* 2000;87:992-1005.
25. Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, et al. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene* 2001;20:1525-8.
26. Darwanto A, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S. MeCP2 and promoter methylation cooperatively regulate E-cadherin gene expression in colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 2003;94:442-7.
27. Oliveira C, Bordin MC, Grehan N, et al. Screening E-cadherin in gastric cancer families reveals germline mutations only in hereditary diffuse gastric cancer kindred. *Hum Mutat* 2002;19:510-7.
28. Grady WM, Willis J, Guilford PJ, et al. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet* 2000;26:16-7.
29. Aberle H, Schwartz H, Kemler R. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *Journal of cellular biochemistry* 1996;61:514-23.
30. Fitzgerald RC, Hardwick R, Huntsman D, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *J Med Genet* 2010;47:436-44.
31. Carneiro F, Huntsman DG, Smyrk TC, et al. Model of the early development of diffuse gastric cancer in E-cadherin mutation carriers and its implications for patient screening. *J Pathol* 2004;203:681-7.
32. Zhou YN, Xu CP, Han B, et al. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol* 2002;8:987-93.
33. van der Post RS, Vogelaar IP, Carneiro F, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. *J Med Genet* 2015;52:361-74.
34. Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *J Med Genet* 1999;36:873-80.
35. Pharoah PD, Guilford P, Caldas C, International Gastric Cancer Linkage C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology* 2001;121:1348-53.

36. Brooks-Wilson AR, Kaurah P, Suriano G, et al. Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *J Med Genet* 2004;41:508-17.
37. Frebourg T, Oliveira C, Hochain P, et al. Cleft lip/palate and CDH1/E-cadherin mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *J Med Genet* 2006;43:138-42.
38. Kluijdt I, Siemerink EJ, Ausems MG, et al. CDH1-related hereditary diffuse gastric cancer syndrome: clinical variations and implications for counseling. *Int J Cancer* 2012;131:367-76.
39. Mastoraki A, Danias N, Arkadopoulos N, Sakorafas G, Vasiliou P, Smyrniotis V. Prophylactic total gastrectomy for hereditary diffuse gastric cancer. Review of the literature. *Surg Oncol* 2011;20:e223-6.
40. Corso G, Marrelli D, Pascale V, Vindigni C, Roviello F. Frequency of CDH1 germline mutations in gastric carcinoma coming from high- and low-risk areas: metanalysis and systematic review of the literature. *BMC Cancer* 2012;12:8.
41. Moreira-Nunes CA, Barros MB, do Nascimento Borges B, et al. Genetic screening analysis of patients with hereditary diffuse gastric cancer from northern and northeastern Brazil. *Hered Cancer Clin Pract* 2014;12:18.
42. Kaurah P, MacMillan A, Boyd N, et al. Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *JAMA* 2007;297:2360-72.
43. Van Domselaar F, Correa D, Vaccaro C, et al. [Hereditary diffuse gastric cancer (HDGC): presentation of a family with a new mutation of the CDH1 gene]. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2007;37:158-63.
44. de Campos EC, Ribeiro S, Higashi R, Manfredini R, Kfour D, Cavalcanti TC. Hereditary diffuse gastric cancer: laparoscopic surgical approach associated to rare mutation of CDH1 gene. *Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva : ABCD = Brazilian archives of digestive surgery* 2015;28:149-51.
45. Wilner G. Alterações genéticas da E-caderina/CDH1 em pacientes com câncer gástrico familiar. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2005.
46. Bacani JT, Soares M, Zwingerman R, et al. CDH1/E-cadherin germline mutations in early-onset gastric cancer. *J Med Genet* 2006;43:867-72.
47. Corso G, Pedrazzani C, Pinheiro H, et al. E-cadherin genetic screening and clinico-pathologic characteristics of early onset gastric cancer. *Eur J Cancer* 2011;47:631-9.
48. Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, et al. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J* 1995;14:6107-15.
49. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 2009;37:e67.
50. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* 1997;4:311-23.
51. Yeo G, Burge CB. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* 2004;11:377-94.
52. Brunak S, Engelbrecht J, Knudsen S. Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J Mol Biol* 1991;220:49-65.
53. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics*

in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics 2015;17:405-24.

54. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 2001;11:863-74.

55. Tavtigian SV, Deffenbaugh AM, Yin L, et al. Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *J Med Genet* 2006;43:295-305.

56. Mathe E, Olivier M, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Tavtigian SV. Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods. *Nucleic Acids Res* 2006;34:1317-25.

57. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One* 2012;7:e46688.

58. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods* 2010;7:248-9.

59. Brito LA, Yamamoto GL, Melo S, et al. Rare Variants in the Epithelial Cadherin Gene Underlying the Genetic Etiology of Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate. *Hum Mutat* 2015;36:1029-33.

60. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D980-5.

61. Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, Celli J, Laros JF, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat* 2011;32:557-63.

62. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa Nacional de Saúde 2013. Percepção do estado de saúde, estilo de vida e doenças crônicas. <ftp://ftp.ibge.gov.br/PNS/2013/pns2013.pdf> 2014.

63. Sistema de Vigilância Alimentar Nutricional. Sisvan Web. http://dabsistemas.saude.gov.br/sistemas/sisvan/relatorios_publicos/relatorios.php.

64. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Alcool e Outras Drogas. Segundo Levantamento Nacional de Alcool e Drogas (II LENAD). Relatório 2012. <http://inpad.org.br/wp-content/uploads/2014/03/Lenad-II-Relat%C3%B3rio.pdf> 2012.

65. Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Boyd J. Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nat Genet* 1994;7:98-102.

66. Ascano JJ, Frierson H, Jr., Moskaluk CA, et al. Inactivation of the E-cadherin gene in sporadic diffuse-type gastric cancer. *Mod Pathol* 2001;14:942-9.

67. Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, et al. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 1995;374:327-37.

68. Suriano G, Oliveira C, Ferreira P, et al. Identification of CDH1 germline missense mutations associated with functional inactivation of the E-cadherin protein in young gastric cancer probands. *Hum Mol Genet* 2003;12:575-82.

69. Valente AL, Rummel S, Shriver CD, Ellsworth RE. Sequence-based detection of mutations in cadherin 1 to determine the prevalence of germline mutations in patients with invasive lobular carcinoma of the breast. *Hered Cancer Clin Pract* 2014;12:17.

70. Suriano G, Mulholland D, de Wever O, et al. The intracellular E-cadherin germline mutation V832 M lacks the ability to mediate cell-cell adhesion and to suppress invasion. *Oncogene* 2003;22:5716-9.

71. Suriano G, Yew S, Ferreira P, et al. Characterization of a recurrent germ line mutation of the E-cadherin gene: implications for genetic testing and clinical management. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005;11:5401-9.

72. Suriano G, Seixas S, Rocha J, Seruca R. A model to infer the pathogenic significance of CDH1 germline missense variants. *Journal of molecular medicine* 2006;84:1023-31.
73. Gaston D, Hansford S, Oliveira C, et al. Germline mutations in MAP3K6 are associated with familial gastric cancer. *PLoS Genet* 2014;10:e1004669.
74. Majewski IJ, Kluijt I, Cats A, et al. An alpha-E-catenin (CTNNA1) mutation in hereditary diffuse gastric cancer. *J Pathol* 2013;229:621-9.

8. Anexos

Anexo 1 – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP)

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FMUSP
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
<p>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</p> <p>Título da Pesquisa: Identificação De Mutações Deletérias Germinativas e Somáticas No Gene E-caderina / CDH1 e De Fatores Ambientais De Risco Em Pacientes Jovens Portadores De Câncer Gástrico</p> <p>Pesquisador: Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira</p> <p>Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);</p> <p>Versão: 4</p> <p>CAAE: 02387712.5.0000.0065</p> <p>Instituição Proponente: FUNDACAO FACULDADE DE MEDICINA</p> <p>Patrocinador Principal: Financiamento Próprio</p> <p>DADOS DO PARECER</p> <p>Número do Parecer: 427.151</p> <p>Data da Relatoria: 17/10/2013</p> <p>Apresentação do Projeto: Projeto tem como objetivo peincipal associar pacientes com neoplasia de estômago com diagnóstico feito com menos de 40 anos de idade com mutação no gene da E-caderina.</p> <p>Objetivo da Pesquisa: Identificação De Mutações Deletérias Germinativas e Somáticas No Gene E-caderina / CDH1 e De Fatores Ambientais De Risco Em Pacientes Jovens Portadores De Câncer Gástrico.</p> <p>Avaliação dos Riscos e Benefícios: risco mínimo e benefícios ausentes.</p> <p>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Estudo interessante que pode ter aplicação populacional.</p> <p>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Adequados</p>								
<table style="width: 100%;"> <tr> <td>Endereço: DOUTOR ARNALDO 455</td> <td>CEP: 01.246-903</td> </tr> <tr> <td>Bairro: PACAEMBU</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: SAO PAULO</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (11)3061-8004</td> <td>E-mail: cep.fm@usp.br</td> </tr> </table>	Endereço: DOUTOR ARNALDO 455	CEP: 01.246-903	Bairro: PACAEMBU		UF: SP	Município: SAO PAULO	Telefone: (11)3061-8004	E-mail: cep.fm@usp.br
Endereço: DOUTOR ARNALDO 455	CEP: 01.246-903							
Bairro: PACAEMBU								
UF: SP	Município: SAO PAULO							
Telefone: (11)3061-8004	E-mail: cep.fm@usp.br							

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 427.151

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP aprova na sua versão reformulada, após sugestões do CONEP

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

SAO PAULO, 17 de Outubro de 2013

Assinador por:
Roger Chammas
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 455

Bairro: PACAEMBU

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3061-8004

CEP: 01.246-903

E-mail: cep.fm@usp.br

Anexo 2 – Questionário para avaliar hábitos, condições socioambientais e história familiar em pacientes diagnosticados com câncer gástrico.

A. IDENTIFICAÇÃO

1A. Data da entrevista: ____/____/ ____

2A. Situação do(a) paciente no estudo

(1) caso (2) controle

3A. Se for caso, qual o diagnóstico (tipo de tumor)?

4A. Atualmente esta fazendo algum tipo de tratamento?

(1) Sim (2) Não

5A. Se sim, qual?

(1) quimioterapia. Qual _____

(2) radioterapia. Qual _____

(3) hormonioterapia. Qual _____

(4) outros

6A. Número do(a) paciente no estudo: _____

7A. Nome completo do(a) paciente (iniciais): _____

8A. Número do prontuário: _____

9A. Data de Nascimento: ____/____/ ____

10A. Idade: _____ anos

11A. Início da entrevista: ____ hs ____ min

B. INTRODUÇÃO

Meu nome é ____ . De início quero agradecer o(a) senhor(a) por participar deste estudo. Nós estamos conduzindo um estudo com a finalidade de esclarecer se determinadas características e hábitos podem ter relação com câncer. Eu farei várias perguntas cujas respostas serão registradas neste caderno. Devo dizer que tudo que a senhora responder na entrevista será estritamente confidencial e as informações colhidas das inúmeras pessoas que irão participar do estudo serão usadas apenas em relatos científicos, sem nenhuma identificação pessoal.

Os possíveis benefícios desse estudo dependem de que as respostas sejam as mais reais (verdadeiras, sinceras) possíveis. A qualquer momento a senhora pode se recusar a continuar ou a responder perguntas específicas. Além do questionário o

estudo inclui a coleta de uma amostra de sangue e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

C. DADOS GERAIS

1C. Baseada no bronzeamento e queimadura de sol, cor de olhos e cabelos, qual sua cor da pele? Classificação de Fitzgerald para a definição de cores de pele, usando a escala de Von Luschan.

<i>Resp.</i>	<i>Tipo</i>	<i>Descrição de Pele</i>	<i>Reação ao Sol</i>	<i>Cor dos Olhos e Cabelos</i>	<i>Escala de von Luschan</i>
(1)	I	muito clara, ou "celta"[4]	Queima com frequência, raramente bronzeia.	A presença de sardas é frequente; cabelos ruivos, castanhos ou loiros e olhos claros: azuis, verdes, cinzas e etc.	1-5
(2)	II	clara; europeu de pele clara[4]	Queima com frequência, às vezes bronzeia.	Cabelos claros ou escuros, e olhos azuis, verdes, castanhos, cinzas e âmbar.	6-10
(3)	III	clara média; europeu de pele escura, ou ainda, caucasiano médio"[4]	Às vezes queima, bronzeia com frequência.	Geralmente, cabelos castanhos e olhos azuis, verdes, castanhos, âmbar e, raramente, pretos.	11-15
(4)	IV	escura média; pessoas típicas do "Mediterrâneo" (sul da Europa e norte da África), ou ainda, pele cor de oliva"[4]	Raramente queima, bronzeia com frequência.	Geralmente, cabelos castanhos escuros, pretos e olhos azuis, verdes, castanhos ou, ainda, pretos.	16-20
(5)	V	escura, "marrom" ou "parda"	Pele natural marrom-negra.	Cabelos pretos e olhos castanhos ou pretos.	21-28
(6)	VI	muito escura ou "negra"	Pele natural negra.	Cabelos e olhos pretos, com poucas variações.	29-36

2C. Qual sua ancestralidadePai

(1) africano (2) europeu (3) asiático (4) indígena (5) oriental (6) Judaico (7) Brasileiro
(8) outro _____ (9) não sabe

Mãe

(1) africano (2) europeu (3) asiático (4) indígena (5) oriental (6) Judaico (7) Brasileiro
(8) outro _____ (9) não sabe

Avô paterno

(1) africano (2) europeu (3) asiático (4) indígena (5) oriental (6) Judaico (7) Brasileiro
(8) outro _____ (9) não sabe

Avó paterna

(1) africano (2) europeu (3) asiático (4) indígena (5) oriental (6) Judaico (7) Brasileiro
(8) outro _____ (9) não sabe

Avô materno

(1) africano (2) europeu (3) asiático (4) indígena (5) oriental (6) Judaico (7) Brasileiro
(8) outro _____ (9) não sabe

Avó materna

(1) africano (2) europeu (3) asiático (4) indígena (5) oriental (6) Judaico (7) Brasileiro
(8) outro _____ (9) não sabe

3C. Aonde o(a) senhor(a) nasceu?

(1) zona rural (2) zona urbana (3) zona semi-urbana (9) não sabe

Estado: _____ Município: _____ País: _____

4C. Onde morou quando tinha:

- a) até 10 anos _____
- b) 11-20 anos _____
- c) 21-30 anos _____
- d) 31-40 anos _____

5C. Qual sua religião?

(1) católico	(6) testemunha de Jeová
(2) evangélico	(7) judeu
(3) espírita	(8) nenhuma
(4) budista	(9) outros _____
(5) adventista	

E. ESCOLARIDADE**D1. O(a) senhor(a) é alfabetizada?**

(1) Sim (2) Não

D2. Qual sua escolaridade?

(1) Fundamental I incompleto	(4) Fundamental II completo (5 a 9º ano)
(2) Fundamental I completo (1 a 4º ano)	(5) Ensino Médio incompleto
(3) Fundamental II incompleto	(6) Ensino Médio completo

- (7) Ensino Superior incompleto
- (8) Ensino Superior completo

(9) Nenhuma

D3. Qual a escolaridade de seu pai?

- (1) Fundamental I incompleto
- (2) Fundamental I completo (1 a 4º ano)
- (3) Fundamental II incompleto
- (4) Fundamental II completo (5 a 9º ano)

- (5) Ensino Médio incompleto
- (6) Ensino Médio completo
- (7) Ensino Superior incompleto
- (8) Ensino Superior completo
- (9) Nenhuma

D4. Qual a escolaridade da sua mãe?

- (1) Fundamental I incompleto
- (2) Fundamental I completo (1 a 4º ano)
- (3) Fundamental II incompleto
- (4) Fundamental II completo (5 a 9º ano)
- (5) Ensino Médio incompleto

- (6) Ensino Médio completo
- (7) Ensino Superior incompleto
- (8) Ensino Superior completo
- (9) Nenhuma

F. HISTÓRIA PROFISSIONAL

E1. Qual sua situação profissional agora?

- (1) trabalhando
- (2) desempregada
- (3) aposentada
- (4) não trabalhando devido a doença permanente
- (5) nunca trabalhou
- (6) outros

E2. Se a resposta for 2, 3 e 4 com quantos anos o(a) senhor(a) deixou de trabalhar? _____ anos

E3. Que tipo de atividade o(a) senhor(a) desempenha ou desempenhou em seu trabalho?

- (1) agricultura/trabalho em fazendas/pesca
- (2) indústria têxtil/costura
- (3) indústria
- (4) administração/escritório
- (5) serviços/vendas
- (6) serviço doméstico (em outras residências)
- (7) garçom em bares, restaurantes/discotecas
- (8) cabelereira
- (9) Outra _____

E4. Quantas horas por dia o(a) senhor(a) trabalha ou trabalhava? _____ hs

E5. Por quanto tempo o(a) senhor(a) trabalha ou trabalhou nesta atividade? _____ anos

E6. O(a) senhor(a) já teve outros empregos antes desse?

- (1) Sim (2) Não

E7. Se *Sim*, com que tipo de atividade?

- (1) agricultura/trabalho em fazendas/pesca
 (2) indústria têxtil/costura
 (3) indústria
 (4) administração/escritório
 (5) serviços/vendas
 (6) serviço doméstico (em outras residências)
 (7) garçom em bares, restaurantes/discotecas
 (8) cabelereira
 (9) Outra _____

E8. Por quanto tempo? ____ anos

G. HISTÓRIA MENSTRUAL E OBSTÉTRICA

F1. Quantos anos a senhora tinha quando ficou menstruada pela primeira vez? ____ anos

F2. A senhora ainda menstrua?

- (1) Sim (2) Não

Se *Sim*, pular para **F4**.

F3. Se *Não*, com que idade a senhora parou de menstruar? ____ anos

F4. A menstruação parou de vir depois de alguma tratamento/cirurgia?

- (1) Sim (2) Não

F4.A. Se sim, qual

- (1) cirurgia (2) quimioterapia (3) hormonioterapia (4) radioterapia

F5. Sua menstruação ocorre normalmente todos os meses?

- (1) Sim (2) Não

F6. Como são seus ciclos menstruais? (excluir os ciclos em período de uso de pílula anticoncepcional)

- (1) menos de 26 dias (4) muito irregulares
 (2) 26-30 dias (9) não sabe informar
 (3) mais de 41 dias

F8. Atualmente a senhora usa algum método contraceptivo?

- (1) Sim (2) Não

F9. Qual _____ **F9A.** Idade que iniciou? ____ anos

F10. A senhora já usou outros métodos contraceptivos?

(1) Sim (2) Não

Qual _____ Idade-iniciou _____ Idade-parou _____ Pq parou _____

Qual _____ Idade-iniciou _____ Idade-parou _____ Pq parou _____

Qual _____ Idade-iniciou _____ Idade-parou _____ Pq parou _____

F7. A senhora está grávida agora?

(1) Sim (2) Não

F8. A senhora já ficou grávida alguma vez?

(1) Sim (2) Não

Se *Não*, pular para **F14**.

F9. Caso à senhora tenha engravidado, quantas vezes foram? _____

F10. Qual a idade da primeira gestação?

F11. A senhora já teve algum aborto?

(1) Sim (2) Não

Se *Não*, pular para **F17**.

F12. Se *Sim*, quantos naturais? _____

F13. Quantos provocados? _____

F14. Se a senhora nunca engravidou, tal fato ocorreu devido a:

(1) decisão individual ou do casal

(2) tentou engravidar, mas não conseguiu

(3) não sabe explicar

H. HISTÓRIA FAMILIAR

G1. Qual o seu estado civil atual?

(1) solteiro(a)

(4) divorciado(a)

(2) casado(a)/união estável

(5) viúvo(a)

(3) separado(a)

(6) outros _____

ANTECEDENTE PESSOAL DE CÂNCER

G4. O(a) senhor(o) tem antecedente pessoal de câncer?

(1) Sim

(2) Não

Se *Não*, pular para **G7**.

G5. Com quantos anos foi diagnosticado(o) com a doença? _____ anos

G6. Qual o local do tumor?

(1) mama	(9) pulmão	(15) carcinoma
(2) ovário	(10) cabeça e pescoço	basocelular ou
(3) colon	(11) estômago	espinocelular da pele
(4) pâncreas	(12) esôfago	(16) Carcinoma in situ
(5) melanoma	(13) colo de útero	do colo do útero
(6) sarcoma	(14) carcinoma in situ	(17) próstata
(7) tumor cerebral	da mama	(18) outros: _____
(8) linfoma/leucemia		

ANTECEDENTE FAMILIAR DE CÂNCER EM PARENTES DE 1º GRAU
(PAI, MÃE, IRMÃO, IRMÃ, FILHO E FILHA)

G7. Quantos irmãos/irmãs o(a) senhor(a) têm?

1	2	3	4	5
6	7	8	9	10

- (1) Não tenho sou filho(a) único(a)
 (2) Não sei
 (3) Outros (especificar o número): _____

G8. O(a) senhor(a) tem história familiar de câncer em parentes de **1º grau**?

- (1) Sim (2) Não

Se *Não*, pular para **G33**.

G9. Se *Sim*, qual familiar acometido?

- (2) pai (2) mãe (3) irmão (4) irmã (5) filho (6) filha

A- Pai

G10. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? ____ anos

G11. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G12. Atualmente ele encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G13. Laudo histopatológico:

B- Mãe

G14. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? ____ anos

G15. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G16. Atualmente ela encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G17. Laudo histopatológico:

C- Irmão

G18. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? ____ anos

G19. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G20. Atualmente ele encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G21. Laudo histopatológico:

D- Irmã

G22. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? ____ anos

G23. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G24. Atualmente ela encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G25. Laudo histopatológico:

E- Filho

G26. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? ____ anos

G27. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G28. Atualmente ele encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G29. Laudo histopatológico:

F- Filha

G30. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? ____ anos

G31. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G31. Atualmente ela encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G32. Laudo histopatológico:

ANTECEDENTE FAMILIAR DE CÂNCER EM PARENTES DE 2º GRAU
(AVÔ, AVÓ, TIO E TIA)

LADO PATERNO

G33. Quantos irmãos/irmãs seu pai têm?

1	2	3	4	5
6	7	8	9	10

- (1) Não tem é filho único
 (2) Não sei
 (3) Outros (especificar o número): _____

G34. O(a) senhor(a) tem história familiar de câncer em parentes de **2º grau** do **LADO PATERNO?**

- (1) Sim (2) Não

Se *Não*, pular para **G52**.

G35. Se *Sim*, qual familiar acometido?

- (1) avô (2) avó (3) tio (4) tia

G- Avô

G36. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? ____ anos

G37. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G38. Atualmente ele encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G39. Laudo histopatológico:

H- Avó

G40. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? ____ anos

G41. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G42. Atualmente ela encontra-se:

(1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G43. Laudo histopatológico:

I- Tio

G44. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? ____ anos

G45. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G46. Atualmente ele encontra-se:

(1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G47. Laudo histopatológico:

J- Tia

G48. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? ____ anos

G6. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G49. Atualmente ela encontra-se:

(1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G50. Laudo histopatológico:

LADO MATERNO

G51. Quantos irmãos/irmãs sua mãe têm?

1	2	3	4	5
6	7	8	9	10

- (4) Não tem é filha única
 (5) Não sei
 (6) Outros (especificar o número): _____

G52. O(a) senhor(a) tem história familiar de câncer em parentes de **2º grau** do **LADO MATERNO**

- (1) Sim (2) Não

Se *Não*, pular para **G67**.

G53. Se *Sim*, qual familiar acometido?

- (1)avô (2) avó (3) tio (4) tia

K- Avó

G54. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? ____ anos

G55. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G55. Atualmente ele encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G56. Laudo histopatológico:

L- Avô

G57. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? ____ anos

G6. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G58. Atualmente ela encontra-se:

(1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G59. Laudo histopatológico:

M- Tio

G60. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? ____ anos

G61. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G62. Atualmente ele encontra-se:

(1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G63. Laudo histopatológico:

N- Tia

G64. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? ____ anos

G6. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G65. Atualmente ela encontra-se:

(1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G66. Laudo histopatológico:

ANTECEDENTE FAMILIAR DE CÂNCER EM PARENTES DE 3º GRAU
(BISAVÓ, BISAVÔ, TIO AVÓ, TIA AVÔ, PRIMO, PRIMA)

LADO PATERNO

G67. O(a) senhor(a) tem história familiar de câncer em parentes de **3º grau** do LADO PATERNO?

- (1) Sim (2) Não

Se *Não*, pular para **G92**.

G68. Se *Sim*, qual familiar acometido?

- (1) Bisavô (2) bisavó (3) tio avó (4) tia avô (5) primo (6) prima

A- Bisavô

G69. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? ____ anos

G70. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G71. Atualmente ele encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G72. Laudo histopatológico:

B- Bisavó

G73. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? ____ anos

G74. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G75. Atualmente ela encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G76. Laudo histopatológico:

C- Tio avô

G77. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? ____ anos

G78. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G79. Atualmente ele encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G80. Laudo histopatológico:

D- Tia avô

G81. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? _____ anos

G6. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G82. Atualmente ela encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G83. Laudo histopatológico:

E- Primo

G84. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? _____ anos

G85. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G86. Atualmente ele encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G87. Laudo histopatológico:

F- Prima

G88. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? ____ anos

G89. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G90. Atualmente ela encontra-se:

(1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G91. Laudo histopatológico:

LADO MATERNO

G92. O(a) senhor(a) tem história familiar de câncer em parentes de **3º grau** do LADO MATERNO?

(2) Sim (2) Não

Se *Não*, pular para **G115**.

G93. Se *Sim*, qual familiar acometido?

(2) Bisavô (2) bisavó (3) tio avô (4) tia avô (5) primo (6) prima

G- Bisavô

G94. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? ____ anos

G95. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G96. Atualmente ele encontra-se:

(1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G97. Laudo histopatológico:

H- Bisavó

G98. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? ____ anos

G6. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G99. Atualmente ela encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G100. Laudo histopatológico:

I- Tio avô

G101. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? _____ anos

G102. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G103. Atualmente ele encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3)

J- Tia avô

G105. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? _____ anos

G6. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G106. Atualmente ela encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G107. Laudo histopatológico:

K- Primo

G108. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? ____ anos

G6. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G109. Atualmente ele encontra-se:

(1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G110. Laudo histopatológico:

L- Prima

G111. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? ____ anos

G112. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G113. Atualmente ela encontra-se:

(1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G114. Laudo histopatológico:

ANTECEDENTE FAMILIAR DE CÂNCER EM PARENTES DE 4º GRAU
(TATARAVÓ, TATARAVÔ, TIO BISAVÓ, TIA BISAVÔ, FILHOS DO(A) PRIMO(A))

LADO PATERNO

G115. O(a) senhor(a) tem história familiar de câncer em parentes de 4º grau do LADO PATERNO?

- (1) Sim (2) Não

Se *Não*, pular para **G140**.

G116. Se *Sim*, qual familiar acometido?

- (1) tataravô, tataravó (2) tio bisavô (3) tia bisavó (4) primo (filho do primo)
 (5) prima (filha da prima)

M- Tataravô

G117. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? ____ anos

G118. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G119. Atualmente ele encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G120. Laudo histopatológico:

N- Tataravó

G121. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? ____ anos

G122. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G123. Atualmente ela encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G124. Laudo histopatológico:

O- Tio bisavô

G125. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? ____ anos

G126. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G127. Atualmente ele encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G128. Laudo histopatológico:

P- Tia bisavô

G129. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? _____ anos

G130. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G131. Atualmente ela encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G132. Laudo histopatológico:

Q- Primo – (filho do primo)

G133. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? _____ anos

G134. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G135. Atualmente ele encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G8. Laudo histopatológico:

R- Prima – (filha da prima)

G136. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? ____ anos

G137. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G138. Atualmente ela encontra-se:

(1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G139. Laudo histopatológico:

LADO MATERNO

G140. O(a) senhor(a) tem história familiar de câncer em parentes de 4º grau do LADO MATERNO?

(2) Sim (2) Não

Se *Não*, pular para **G169**.

G141. Se *Sim*, qual familiar acometido?

(2) tataravô, tataravó (2) tio bisavô (3) tia bisavó (4) primo (filho do primo)
(5) prima (filha da prima)

S- Tataravô

G142. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? ____ anos

G143. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G144. Atualmente ele encontra-se:

(1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G145. Laudo histopatológico:

T- Tataravó

G146. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? ____ anos

G147. Qual o local do tumor?

(1) mama	(2) ovário	(3) colon

(4) pâncreas	(8) linfoma/leucemia	(12) esôfago
(5) melanoma	(9) pulmão	(13) colo de útero
(6) sarcoma	(10) cabeça e pescoço	(14) próstata
(7) tumor cerebral	(11) estômago	(15) outros: _____

G148. Atualmente ela encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G149. Laudo histopatológico:

U- Tio bisavô

G150. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? ____ anos

G151. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G152. Atualmente ele encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G153. Laudo histopatológico:

V- Tia bisavô

G154. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? ____ anos

G155. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G156. Atualmente ela encontra-se:

- (1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G157. Laudo histopatológico:

W- Primo – (filho do primo)

G158. Com quantos anos ele foi diagnosticado com a doença? ____ anos

G159. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G160. Atualmente ele encontra-se:

(1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G161. Laudo histopatológico:

X- Prima – (filha da prima)

G162. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? ____ anos

G163. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G67. Atualmente ela encontra-se:

(1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G168. Laudo histopatológico:

G169. Heredograma

Y- Prima – (filha da prima)

G162. Com quantos anos ela foi diagnosticada com a doença? ____ anos

G163. Qual o local do tumor?

(1) mama	(6) sarcoma	(11) estômago
(2) ovário	(7) tumor cerebral	(12) esôfago
(3) colon	(8) linfoma/leucemia	(13) colo de útero
(4) pâncreas	(9) pulmão	(14) próstata
(5) melanoma	(10) cabeça e pescoço	(15) outros: _____

G67. Atualmente ela encontra-se:

(1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morto por câncer (4) morto/outras causas

G168. Laudo histopatológico:

G169. Heredograma

I. HISTÓRIA SOCIAL – TABAGISMO

H1. O(a) senhor(a) se enquadra, em relação ao hábito de fumar, em que condição:

- (1) fumante*
- (2) ex-fumante**
- (3) nunca fumou

Se resposta for 3, pular para **H11**.

*Fumante se já fumou alguma vez na vida pelo menos um cigarro por dia durante um período mínimo de três meses.

**Ex-fumante a fumante anterior que interrompeu o hábito há pelo menos um ano.

H2. Com quantos anos o(a) senhor(a) tentou fumar pela primeira vez? _____ anos

H3. Com que idade o(a) senhor(a) começou a fumar regularmente (todos os dias por mais de 1 ano)?

(1) 10-20 anos	(3) 31-40 anos
(2) 21-30 anos	(4) não lembra

H4. Em algum momento de sua vida o(a) senhor(a) parou e depois voltou a fumar?

- (1) Sim
- (2) Não

H5. Quanto tempo neste período o(a) senhor(a) ficou sem fumar? _____ meses

H7. Qual tipo de tabaco o(a) senhor(a) fuma/fumava?

(1) manufaturado com filtro	(6) charuto
(2) manufaturado, sem filtro	(7) cachimbo
(3) enroladinho de papel	(8) outros
(4) enroladinho de palha	(9) não sabe
(5) tabaco de mascar	

H8. Durante o tempo que o(a) senhor(a) fuma/fumou, quantos pacotes de cigarro geralmente fuma/fumava por dia?

(1) Menos da metade do pacote	(6) Dois pacotes e meio
(2) Metade do pacote	(7) Três pacotes
(3) Um pacote	(8) Três pacotes e meio
(4) Um pacote e meio	(9) Mais de quatro pacotes
(5) Dois pacotes	(10) não lembra

H9. De acordo com cada idade, quantos cigarros, charutos, cachimbos o(a) senhor(a) fumava por dia?

A- Aos 10-20 anos:

- (1) Menos da metade do pacote
- (2) Metade do pacote
- (3) Um pacote
- (4) Um pacote e meio
- (5) Dois pacotes
- (6) Dois pacotes e meio
- (7) Três pacotes
- (8) Três pacotes e meio
- (9) Mais de quatro pacotes
- (10) não lembra

(4) Um pacote e meio

(5) Dois pacotes

(6) Dois pacotes e meio

(7) Três pacotes

(8) Três pacotes e meio

(9) Mais de quatro pacotes

(10) não lembra

C- Acima dos 40 anos:

(1) Menos da metade do pacote

(2) Metade do pacote

(3) Um pacote

(4) Um pacote e meio

(5) Dois pacotes

(6) Dois pacotes e meio

(7) Três pacotes

(8) Três pacotes e meio

(9) Mais de quatro pacotes

(10) não lembra

B- Aos 21-30 anos:

(1) Menos da metade do pacote

(2) Metade do pacote

(3) Um pacote

H10. O(a) senhor(a) já fumou maconha em algum momento de sua vida?

- (1) Sim
- (2) Não

Se *Não*, pular para **H14**.

H11. O(a) senhor(a) fuma ou já fumou maconha (marijuana) regularmente (pelo menos uma vez por semana pelo menos por 6 meses)?

- (1) Sim
- (2) Não

H12. Se *Sim*, com que idade começou? _____ e parou? _____

H13. Quantas vezes por semana fuma/fumava maconha?

- (1) 1-2 vezes
- (2) 3-4 vezes
- (3) 5-6 vezes
- (4) todos os dias

H14. A senhora esteve ou esta casada com um(a) fumante?

- (1) Sim
- (2) Não

Se *Não*, pular para **H16**.

H16. Em sua casa o(a) senhor(a) convive com fumantes? Quantas pessoas? _____

- (1) Sim
- (2) Não

Se *Não*, pular para **H19**.

H17. Em sua casa ou trabalho, o(a) senhor(a) acha que respira fumaça de em média por mais de 2 horas por dia?

- (1) Sim (2) Não

H18. Em sua casa ou trabalho o(a) senhor(a) acha que nos últimos 10 anos respirou fumaça de cigarros em média por mais de 2 horas por dia?

- (1) Sim (2) Não

H19. Quando era criança/adolescente (abaixo de 18 anos de idade) morou com adultos que fumavam cigarros (charuto/cachimbo) em sua casa?

- (1) Sim (2) Não

J. HISTÓRIA SOCIAL – ÁLCOOL

I1. O(a) senhor(a) já bebeu bebidas alcoólicas pelo menos uma vez por mês por mais de um ano?

- (1) Sim, ainda bebe (2) Nunca (3) Só no passado

Se a resposta for 2, pular para **J1**.

I2. Com que idade o (a) senhor(a) experimentou bebida alcoólica pela primeira vez?

- (1) 10-20 anos (2) 21-30 anos (3) 31-40 anos (4) não lembra

I3. Com que idade o(a) senhor(a) começou a beber regularmente (pelo menos uma vez ao mês)?

- (1) 10-20 anos (2) 21-30 anos (3) 31-40 anos (4) não lembra

I6. O(a) senhor(a) consome/consumia vinho?

- (1) Sim (02) Não

Se *Não*, pule para **I9**.

I7. Se *Sim*, quantas taças (200ml) por semana?

- (1) 1 a 2 taças (4) 7 a 8 taças
(2) 3 a 4 taças (5) acima de 9 taças
(3) 5 a 6 taças

I8. De acordo com cada idade, quantas taças de vinho o(a) senhor(a) bebia por semana?

A- Aos 10-20 anos:

- (1) 1 a 2 taças
(2) 3 a 4 taças
(3) 5 a 6 taças
(4) 7 a 8 taças
(5) acima de 9 taças
(6) não lembra

B- Aos 21-30 anos:

- (1) 1 a 2 taças
(2) 3 a 4 taças
(3) 5 a 6 taças
(4) 7 a 8 taças
(5) acima de 9 taças
(6) não lembra

C- Aos 31-40 anos:

- (1) 1 a 2 taças
(2) 3 a 4 taças
(3) 5 a 6 taças
(4) 7 a 8 taças
(5) acima de 9 taças
(6) não lembra

I9. O(a) senhor(a) consome/consumia cerveja?

(01) Sim (2) Não

Se *Não*, pule para **I12**.

I10. Se *Sim*, quantas latinha (350ml) o(a) senhor(a) bebe por semana?

(1) 1 a 2 latinhas

(4) 7 a 8 latinhas

(2) 3 a 4 latinhas

(5) acima de 9 latinhas

(3) 5 a 6 latinhas

I11. De acordo com cada idade, quantas latinhas de cerveja o(a) senhor(a) bebia por semana?

A- Aos 10-20 anos:

B- Aos 21-30 anos:

C- Aos 31-40 anos:

(1) 1 a 2 latinhas

(1) 1 a 2 latinhas

(1) 1 a 2 latinhas

(2) 3 a 4 latinhas

(2) 3 a 4 latinhas

(2) 3 a 4 latinhas

(3) 5 a 6 latinhas

(3) 5 a 6 latinhas

(3) 5 a 6 latinhas

(4) 7 a 8 latinhas

(4) 7 a 8 latinhas

(4) 7 a 8 latinhas

(5) acima de 9

(5) acima de 9

(5) acima de 9

latinhas

latinhas

latinhas

(6) não lembra

(6) não lembra

(6) não lembra

I12. O(a) senhor(a) consome/consumia vodka ou pinga?

(01) Sim (2) Não

Se *Não*, pule para **I15**.

I13. Se *sim*, quantas doses (30ml) o(a) senhor(a) bebe por semana?

(1) menos de 2 doses

(2) 3 a 5 doses

(3) 6 a 8 doses

(4) 9 a 12 doses

(5) acima de 13 doses

I14. De acordo com cada idade, quantas doses de vodka ou pinga o(a) senhor(a) bebia por semana?

A- Aos 10-20 anos

(2) 3 a 5 doses

(1) menos de 2 doses

(3) 6 a 8 doses

(2) 3 a 5 doses

(4) 9 a 12 doses

(3) 6 a 8 doses

(5) acima de 13 doses

(4) 9 a 12 doses

(6) não lembra

(5) acima de 13 doses

(6) não lembra

C- aos 31-40 anos

(1) menos de 2 doses

B- Aos 21-30 anos

(2) 3 a 5 doses

(1) menos de 2 doses

(3) 6 a 8 doses

- (4) 9 a 12 doses
(5) acima de 13 doses

(6) não lembra

I18. O(a) senhor(a) consome/consumia alguma outra bebida?

(1) Sim (2) Não Qual? _____

K. HABITOS DE VIDA

J1. O(a) senhor(a) prática exercícios físicos?

(1) Sim (2) Não

Se *Não*, pule para **K1**.

J2. Se Sim, quantas vezes por semana?

(1) 1 a 2 vezes (3) 5-6 vezes
(2) 3-4 vezes (4) todos os dias

J3. O(a) senhor(a) já praticou exercícios físicos em algum momento de sua vida?

(1) Sim (2) Não

J4. Se Sim, quantas vezes por semana?

(1) 1 a 2 vezes
(2) 3-4 vezes
(3) 5-6 vezes
(4) Todos os dias

J5. Há quanto tempo parou? (1) <6 meses (2) 6 meses a 1 ano (3) 2-5 anos (4) 6-10 anos (5) > 10 anos (9) não sabe

L. HISTÓRIA AMBIENTAL

K1. O(a) senhor(a) vive ou já viveu em área rural onde se usava agrotóxicos (remédios para as plantas?

(1) Sim (2) Não

Se *Não*, pule para **K6**.

K2. Se *Sim*, que tipo de plantações? _____

K3. Se *Sim*, o(a) senhor(a) sabe informar qual tipo de remédio para as plantas são ou eram utilizados? _____

K4. Por quanto tempo o(a) senhor(a) vive ou viveu nesta(s) localidades(s)? _____ anos

K5. Se o(a) senhor(a) não vive mais, quanto tempo faz? _____ anos

K6. O(a) senhor(a) trabalha ou já trabalhou diretamente com agrotóxicos?

(1) Sim (2) Não

Se *Não*, pular para **K8**.

K7. Se *Sim*, especifique:

	<i>Marca</i>	<i>de</i> <i>(idade em anos)</i>	<i>até</i> <i>(idade em anos)</i>
1			
2			
3			

K9. O(a) senhor(a) usa, pelo menos duas vezes por mês, inseticidas para eliminar baratas e/ou outros insetos domésticos?

(1) Sim (2) Não

Se *Não*, pular para **K11**.

K10. Se *Sim*, especifique:

	<i>Tipo de Inseticida</i>	<i>Frequência</i> <i>(vezes por semana)</i>	<i>de</i> <i>(idade em anos)</i>	<i>até</i> <i>(idade em anos)</i>
1				
2				
3				

K11. O(a) senhor(a) usa, pelo menos duas vezes por mês, equipamento químico ou elétrico para eliminar mosquitos e/ou outros insetos voadores domésticos?

(1) Sim (2) Não

Se *Não*, pular para **K13**.

K13. Na sua residência o(a) senhor(a) já foi visitada por profissionais de Serviços Públicos de Higiene Sanitária para eliminação química de insetos?

(1) Sim (2) Não

Se *Não*, pular para **K17**.

K14. Se *Sim*, sabe informar de que órgãos públicos eram estes profissionais?

(1) SUCAM

(2) FEEMA

(3) Outros: _____

K15. Se *Sim*, quantas visitas deste tipo foram feitas em sua casa?

(1) 1x (2) 2x (3) 3x (4) 4x (5) 5x (6) mais de 6x

K17. O(a) senhor(a) faz ou fez uso de serviço especializado particular de dedetização?

(1) Sim (2) Não

Se *Não*, pular para **K20**.

K18. Com que frequência? _____ vezes por ano por ano.

<u>CEREAIS/LEGUMINOSAS</u>													
Arroz integral													
Arroz polido													
Pão integral													
Pão francês/forma													
Macarrão													
Feijão													
<u>HORTALIÇAS E FRUTAS</u>													
Folhas (alface, agrião, rúcula)													
Hortaliças: beterraba, abóbora, brócolis, quiabo													
Tubérculos (mandioca, batata, inhame)													
Frutas													
<u>SOBREMESAS E DOCES</u>													
Doces/bolos													
Chocolates/achocolatados/bombom													
<u>BEBIDAS</u>													
Café													
Suco natural													
Suco artificial													
Refrigerante normal													
<u>PRODUTOS DIET E LIGHT</u>													
Adoçante													
Margarina													
Requeijão/iogurte													
Refrigerante													

- (0) Nenhuma
 (1) Pouco 1-2x por semana
 (2) Médio 3-5x por semana
 (3) Muito 6-7x por semana

L1. Atualmente o(a) senhor (a) sente aversão a algum tipo de alimento?

(1) sim (2) não Qual _____

M. HISTÓRIA PATOLÓGICA PREGRESSA

M1. O(a) senhor(a) já recebeu tratamento para alguma(s) doença(s) abaixo?

- A- Hipertensão arterial (1) Sim (2) Não Idade _____ Qto tempo ____ anos
- B- Deficiência hormonal (1) Sim (2) Não Idade ____ Qto tempo ____ anos
- C- Distúrbio emocional nervoso (1) Sim (2) Não Idade ____ Qto tempo ____ anos
- D- Outras (1) Sim (2) Não Qual _____ Idade ____ Qto tempo ____ anos

M2. O(a) senhor(a) apresenta ou já apresentou problemas gastrointestinais como*:

- A- ulcera (1) Sim (2) Não Idade _____ Há Qto tempo ____ meses
- B- gastrite (1) Sim (2) Não Idade _____ Há Qto tempo ____ meses
- C- *H. pylori* (1) Sim (2) Não Idade _____ Há Qto tempo ____ meses
- D- esofagite (1) Sim (2) Não Idade _____ Há Qto tempo ____ meses
- E- refluxo (1) Sim (2) Não Idade _____ Há Qto tempo ____ meses
- F- colite (1) Sim (2) Não Idade _____ Há Qto tempo ____ meses
- G- outros (1) Sim (2) Não Idade _____ Há Qto tempo ____ meses

*Nota - Para os casos não considerar os relacionados à doença atual.

M3. O(a) senhor(a) já fez uso continua de AAS?

(1) Sim (2) Não

M4. Se sim, qual dose?

(1) < ou = 100mg (2) > 100mg (3) não sabe

M5. Com que frequência o(a) senhor(a) usa?

(1) diariamente (2) dias alternados (3) outos: ____

M6. Por quanto tempo o(a) senhor(a) usa?

(1) < 1 ano (2) 1 a 3 anos (3) 3 a 5 anos (4) > 5 anos (5) não sabe

N. DADOS ANTROPOMÉTRICOS

N1. A sua altura é (sem sapatos): ____ m

N2. O seu peso atual sem roupas é: _____ kg

N3. Quanto o(a) senhor(a) pesava quando tinha a idade de 18 anos de idade? _____ kg

N4. Quanto o(a) senhor(a) pesava em torno dos 30 anos de idade? _____ kg

N5. Qual foi o seu peso máximo excluindo-se os períodos de gestação? _____ kg

Anexo 4 – Apresentação dos resultados preliminares do estudo no 2015 *ASCO Annual Meeting* (*American Society of Clinical Oncology*). J Clin Oncol 33, 2015 (suppl; abstr e12535)

Frequency of *CDH1* germline mutations in diffuse gastric cancer in Brazil.

Subcategory:

Cancer Genetics

Category:

Cancer Prevention, Genetics, and Epidemiology

Meeting:

2015 ASCO Annual Meeting

Session Type and Session Title:

This abstract will not be presented at the 2015 ASCO Annual Meeting but has been published in conjunction with the meeting.

Abstract Number:

e12535

Citation:

J Clin Oncol 33, 2015 (suppl; abstr e12535)

Author(s):

Rodrigo Santa Cruz Guindalini, Fatima Solange Pasini, Ana Carolina Ribeiro Chaves De Gouvea, Priscila Abduch Branas, Marina Candido Visontai Cornedi, Simone Maistro, Maria Lucia Hirata Katayama, Giselly Encinas, Tauana Nagy, Maria Del Pilar Estevez-Diz, Adriana Vaz Safatle-Ribeiro, Ulysses Ribeiro, Maria A. A. Koike Folgueira; Instituto Do Cancer Do Estado De Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil; Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil; Instituto do Cancer do Estado de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil; Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, Brazil; Disciplina de Oncologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil; Departamento de Radiologia e Oncologia, Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; Departamento de Radiologia e Oncologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; Faculdade De Medicina Da USP, São Paulo, Brazil; Instituto do Cancer do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil; Instituto Do Câncer Do Estado De São Paulo, São Paulo, Brazil; University of São Paulo, São Paulo, Brazil; Departamento de Radiologia e Oncologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Abstract Disclosures

Abstract:

Background: Although hereditary diffuse gastric cancer syndrome is a rare condition its contribution to gastric cancer burden in Brazil is unknown. The aim of this study was to examine the frequency of *CDH1* germline mutations in a population-based series of diffuse gastric cancer (DGC) in Brazil, which is considered a middle/high-incidence country for gastric cancer. **Methods:** From October 2013 to October 2014 a total of 64 unrelated and consecutive patients attending a Brazilian public hospital with DGC were enrolled and all *CDH1* exons and intronic boundaries were sequenced. Clinico-pathological features were extracted from electronic medical records. Recruitment for this study is still ongoing. **Results:** Of 64 patients, 57.8% were female and the mean age at gastric cancer diagnosis was 46.6 years (range 21-76); 17% reported family history of gastric cancer in first- or second-degree relatives, 39% were diagnosed ≤ 40 years old, and none of them fulfilled the original 1999 International Gastric Cancer Linkage Consortium criteria for genetic testing. The majority of the tumors were poorly differentiated (84%), and located in the middle and distal-third of the stomach (70%). One germline deleterious mutation (c.1849G>A, p.A617T) was identified in 2 unrelated female patients with DGC (42 years and 47 years) and without family history of gastric cancer (Table 1). The overall frequency of germline *CDH1* mutations was 3.1% (2/64) for DGC. **Conclusions:** To our knowledge, this is the largest population-based study investigating the contribution of *CDH1* germline mutations in DGC cancer in Brazil. For a middle/high-incidence country, mutation frequency was higher than expected. This finding warrants further validation in larger cohort studies.

Clinical characteristics of *CDH1* mutation carriers.

Age	Sex	Stage	Part	Grade	Mucinous	Hp	Fam hist
42 yo	F	IV	body	Poorly differentiated	yes	N/A	no
47 yo	F	IIb	pylorus	Poorly differentiated	no	positive	no

Abbreviations: F, female; Hp, *Helicobacter pylori*; Fam hist, family history of gastric cancer in first- or second-degree relatives; N/A, not available; yo, years old.

Anexo 5 – Apresentação dos resultados preliminares do estudo no *6th Biennial Meeting da The International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours Incorporated (InSiGHT)*. *Familial Cancer* (2015) 14:S1–S91.

Familial Cancer (2015) 14:S1–S91
DOI 10.1007/s10689-015-9808-x

ABSTRACTS

International society for gastrointestinal hereditary tumours—InSiGHT

Published online: 19 May 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

The International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (InSiGHT) is an international multidisciplinary, scientific organization. Its mission is to improve the quality of care of patients and their families with any condition resulting in hereditary gastrointestinal tumours. This mission will be accomplished by:

1. Encouragement of research into all aspects of gastrointestinal hereditary tumour syndromes.
2. Education of physicians and other healthcare professionals in the molecular genetics and clinical management of gastrointestinal hereditary tumour syndromes.
3. Assistance for institutions and individuals interested in beginning or maintaining a registry for families with gastrointestinal hereditary tumour syndromes.

Provision of a forum for the presentation of data, discussion of controversial areas involved in the care of patients and their families, and facilitation of collaborative studies.

Prof. Benedito Mauro Rossi
Chairman

InSiGHT Council Members

Allan Spigelman
Benedito Mauro Rossi—Chairman
Finlay Macrae
Gabriel Capella
Gabriela Moeslein
Hans Vasen
James Church
Maurizio Genuardi
Patrick Lynch
Susan Clark
Susan Parry
Secretary: Kay Francis Neale

6th Biennial InSiGHT Meeting 2015—International Scientific Committee

Annika Lindblom
Edenir Palmero
Elena Stoffel
Erika M.M. Santos
John Burn
Ian Tomlinson
Matthew Kalady
Matthias Kloor
Miguel Rodriguez-Bigas
Patricia Prolla
Renata Coudry
Rolf Sijmons

6th Biennial InSiGHT Meeting 2015—South American Organizing Committee

Anamaria Camargo
Bernardo Garicochea
Carlos Sarroca
Carlos Vaccaro
Dirce Carraro
Fabio Campos
Fabio Ferreira
Fernanda Lima
Francisco Lopez-Kostner
Maria Isabel Achatz

189 Profile of gastrointestinal tumors in a large cancer genetics clinic in Brazil

Maria Nirvana Cruz Formiga; Karina Miranda Santiago;
Amanda França Nobrega; Maria Isabel Waddington Achatz;
Kelvin Cesar Andrade

A.C. Camargo Cancer Center - Sao Paulo, Brazil

Profile of gastrointestinal tumors in a large Cancer Genetics Clinic in Brazil

A total of more than 2000 patients are seen each year at the Oncogenetic Department of AC Camargo Cancer Center, Sao Paulo, Brazil. The Oncogenetic clinic, which covers the full range of hereditary cancer syndromes, has grown from serving about 350 patients in 2000 to more than 2000 patients annually in 2013. The Oncogenetic clinic offers a comprehensive genetic counseling with a multidisciplinary team (physicians, clinical geneticist, nurse and psychologist) for many hereditary cancer syndromes. Considering the high volume of patients seen, a wide variety of gastrointestinal tumors is observed. More than 50 % of the patients have Hereditary breast-ovarian cancer syndrome (HBOC) or Li-Fraumeni syndrome (LFS), both syndromes with predisposition to gastrointestinal tumors: pancreatic and gastric cancer related to BRCA2 germline mutation in HBOC and a large profile of gastrointestinal tumors in LFS. Lynch syndrome is observed in 15 % of the patients and Familial adenomatous polyposis (FAP) in 7 %. Hereditary diffuse gastric syndrome is present in 1 % of the patients; less frequent syndromes as Hereditary paraganglioma-pheochromocytoma syndrome (PGL/PCC), in which the carriers are at elevated risk of development of GIST, Familial melanoma/pancreas cancer linked to germline CDKN2A mutations and other hereditary polyposis are also observed.

The Oncogenetic Department offers an interdisciplinary approach to the diagnosis, treatment and management of patients and their families with hereditary cancer syndromes. For asymptomatic carriers, follow up is planned according to international guidelines for specific hereditary cancer syndrome.

190 Yearly gastroscopy in MLH1 and MSH2 mutation carriers—an endoscopy too far?

Susan Parry, Fiona Honeyman, Julie Arnold, Melanie Stevenson,
John Keating, Christopher Wakeman, Teresa Chalmers-Watson

Nz Familial Gastrointestinal Cancer Service - New Zealand. New Zealand

Purpose: The cumulative risk of gastric cancer in Lynch Syndrome is reported to be 0.2–13 % by the age 70 years (yrs). Family history of gastric cancer is also a poor predictor of risk². Consideration of surveillance gastroscopy in Lynch Syndrome, particularly in MLH1 and MSH2 carriers¹, has been proposed². In May 2011 the New Zealand Familial Gastrointestinal Cancer Service (NZFGICS) made the recommendation that yearly gastroscopy be considered in individuals with an MLH1 or MSH2 mismatch repair gene mutation. To determine the appropriateness of this recommendation in New Zealand, where the endoscopy resource is constrained, an audit of the outcome of surveillance gastroscopy was proposed. A secondary aim, to contextualize the audit, was to identify any confirmed upper gastrointestinal (GI) or small bowel malignancy in these mutation carriers.

Methodology: The NZFGICS progeny database was searched to identify MLH1 and MSH2 mutation carriers (excluding EPCAM) who had been referred for a surveillance gastroscopy after 01/5/2011

and were identified to have (1) malignant or significant upper GI pathology at a surveillance gastroscopy (2) any confirmed malignant upper GI or small bowel pathology. The search included procedures and pathology reported to 01/11/2014.

Results: The NZFGICS database identified 126 MLH1 (66 female) and 152 MSH2 (85 female) mutation carriers. Since 1/5/2011 475 referrals for consideration of gastroscopy were made in 225 living carriers who had consented to be part of the service surveillance programme. Three hundred and twenty gastroscopies were performed in 177 individuals. A first surveillance gastroscopy identified short segment Barrett's oesophagus in a 70 year old male MSH2 mutation carrier and at a further surveillance gastroscopy performed 15 months later, in association with colonoscopy, a 1.5 cm nodular gastro-oesophageal junction adenocarcinoma was identified. A 60 year old female MSH2 mutation carrier was identified at the first surveillance procedure in November 2011 to have a 3 cm duodenal cap cancer. Both underwent curative surgical resection. In addition to these surveillance identified upper GI cancers, symptomatic assessment (before surveillance gastroscopy was introduced) identified two MLH1 mutation carriers with gastric adenocarcinoma at ages 34 and 45 years, four small bowel cancers (mean age 51 years), a duodenal cancer age 60 years and an oesophageal squamous cell carcinoma age 83 years. Two jejunal cancers (mean age 59 years) presented symptomatically after the introduction of surveillance gastroscopy.

Conclusion: In our service 160 gastroscopies in MLH1 and MSH2 mutation carriers were needed to identify one resectable upper GI cancer. Yearly surveillance gastroscopy in NZ may be too frequent and the more recent recommendation¹ of surveillance gastroscopy every 2–3 years, based on patient risk factors, from the age of 30–35 years, may be more appropriate.

References

- Giardello FM, Allen JJ, Axibund JE et al. (2014). Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: a consensus statement by the multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Am J Gastroenterol* 109:1159–1179.
- Capelle LG, Van Grieken NCT, Lingsma HF et al. (2010). Risk and Epidemiological Time Trends of Gastric Cancer in Lynch Syndrome Carriers in The Netherlands. *Gastroenterology* 138:487–492.

Keywords: Gastroscopy · Surveillance · Lynch

192 Frequency of CDH1 germline mutations in early-onset gastric cancer in Brazil

Rodrigo Santa Cruz Guindalini, Ana Carolina Ribeiro Chaves,
Fátima Solange Pasini, Priscila Abduch Bramas, Marina Candido Visontai Cormedi, Maria Lucia Hirata Katayama, Simone Maistro, Giselly Encinas Zanetti, Tauana Nagy, Maria Del Pilar Estevez Diz, Adriana Vaz Safatle-Ribeiro, Ulysses Ribeiro Jr, Maria Aparecida Azevedo Koike Figueira

Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo - Sao Paulo, Brazil

Purpose: To examine the frequency of CDH1 germline mutations in a population-based series of early-onset gastric cancer (EOGC, <50 years old) in Brazil, which is considered a high-incidence country for gastric cancer.

Methodology: From October 2013 to October 2014 a total of 51 unrelated and consecutive patients attending a Brazilian public hospital with EOGC were enrolled and all CDH1 exons and intronic boundaries were sequenced. Clinico-pathological features were

extracted from electronic medical records. All patients signed informed consent before study registration to have blood specimens drawn and analyzed.

Results: Of 51 patients, 59 % were female and the mean age at gastric cancer diagnosis was 38 years (range 21–50); 22 % reported family history of gastric cancer in first- or second-degree relatives. The majority of the tumors were diffuse (82 %), poorly differentiated (76 %), and located in the middle and distal-third of the stomach (59 %). One germline deleterious mutation (c.1849G>A, p.A617T) was identified in 2 unrelated female patients with diffuse EOGC (42 and 47 years) and without family history of gastric cancer. The overall frequency of germline CDH1 mutations was 3.9 % (2/51) for EOGC.

Conclusion: To our knowledge, this is the largest population-based study investigating the contribution of CDH1 germline mutations in early onset gastric cancer in Brazil. For a high-incidence country for gastric cancer, mutation frequency was higher than expected [1,2]. This finding warrants further validation in larger cohort studies.

References

1. Bacani JT, Soares M, Zwingerman R, di Nicola N, Senz J, Riddell R, Huntsman DG and Gallinger S (2006). CDH1/E-cadherin germline mutations in early-onset gastric cancer. *J Med Genet* 43:867–872. doi:10.1136/jmg.2006.043133.
2. Corso G, Marrelli D, Pascale V, Vindigni C and Roviello F (2012). Frequency of CDH1 germline mutations in gastric carcinoma coming from high- and low-risk areas: meta-analysis and systematic review of the literature. *BMC Cancer* 12:8. doi:10.1186/1471-2407-12-8.

Keywords: e-Cadherin · Hereditary diffuse gastric cancer · CDH1

193 Controlling polyposis with colonoscopy: an update

James Michael Church

Sanford Weiss MD Center For Hereditary Colorectal Neoplasia – Cleveland, United States

Introduction: Patients with oligopolyposis (<100 polyps) are often recommended to have a prophylactic colectomy. There is an alternative: colonoscopic control of the polyps. This can be difficult as there are sometimes many polyps and sometimes large flat lesions. We have been controlling polyposis with colonoscopy in many patients for several years and here we report our latest data.

Methods: Any patient with a hereditary colorectal cancer syndrome, or with more than 10 and less than 100 synchronous adenomas, and who had at least three colonoscopies, was eligible for the study. A single endoscopist colonoscopy database was searched and suitable patients added to the study. Their entire colonoscopy experience was summarized by abstracting the number of polyps on their first examination, the number on their last examination, the size of the largest polyp on the first and last examination, and the total number of polyps removed. Results were stratified according to syndrome.

Results: There were 42 patients, mean age 64, including 11 with MYH associated polyposis (MAP)(age 58), 14 with serrated polyposis (age 65), 7 with non specific oligopolyposis (age 67), 5 with PTEN mutation (age 41), 2 with attenuated familial adenomatous polyposis (age 65), 1 with Lynch syndrome, and 2 with hereditary mixed polyposis (age 73). Patients had a mean of 5.2 colonoscopies each over a mean of 6.6 years follow-up. The average number of polyps on first colonoscopy was 27 compared to 8 at the most recent. The average overall size of the largest polyp at the first examination was 24 mm compared to 11 mm for the largest polyp at the most recent examination. Overall average total number of polyps removed was

47. There were no cancers. MAP patients had a mean of 5.8 colonoscopies each over a mean of 4.9 years follow-up. The average number of polyps on first colonoscopy was 53 compared to 14 at the most recent. The average overall size of the largest polyp at the first examination was 22 mm compared to 10 mm for the largest polyp at the most recent examination. Overall average total number of polyps removed was 62. Serrated polyposis patients had a mean of 4.5 colonoscopies each over a mean of 6.7 years follow-up. The average number of polyps on first colonoscopy was 19 compared to 6 at the most recent. The average overall size of the largest polyp at the first examination was 29 mm compared to 12 mm for the largest polyp at the most recent examination. Overall average total number of polyps removed was 37.

Conclusion: Patients with oligopolyposis can be managed by yearly colonoscopy, at least over the short term. This saves patients the hazards and sequelae of surgery.

Keywords: Oligopolyposis · Colonoscopy · Polypectomy

194 Analysis of the susceptibility to colorectal cancer in Brazilian individuals through genotyping known single nucleotide polymorphisms: a replication study

Israel Gomy, Erika Santos, Benedito Rossi, Silvia Rogatto

A.C. Camargo Cancer Center - Sao Paulo - SP - Brazil

Background: Colorectal cancer (CRC) is one of the most prevalent cancers worldwide, the third most common cancer in men and the second one in women, and the fourth leading cause of all cancer deaths. CRC incidence rates have been increasing specially in developing countries, such as Brazil, where is the third most frequent cancer in both genders. Etiology of CRC is multifactorial, both environmental and genetic risk factors interacting with each other, of whom family history plays a special role. CRC heritability is about 35 % and Mendelian syndromes respond for 6 % of the cases. Recently, genome-wide association studies (GWAS) have showed that part of the risk is due to common low penetrant variants, such as single nucleotide polymorphisms (SNPs). Approximately 20 SNPs have been discovered through GWAS from European-descent populations, each one with modest size effects on the CRC risk, but collectively, make great part of populational risk. Non-European replication studies have not achieved enough power to detect significant association.

Aims: to identify ten SNPs previously detected in European populations in the Brazilian population; to calculate allelic and genotypic frequencies of the ten SNPs in cases and controls; to detect effect sizes of the risk alleles and correlate risk with clinical pathological characteristics and family history.

Methods: 1467 individuals (727 cases and 740 controls) were included. Ten SNPs were genotyped (rs6983267, rs4939827, rs4779584, rs16892766, rs10795668, rs4444235, rs9929218, rs10411210, rs961253, rs3802842).

Results: 51 % of cases were male, with mean age at diagnosis of 57 years-old; 30 % fulfilled Bethesda criteria; 3 % were advanced adenomas; rectal and stage III tumors were most frequent at diagnosis, with pericolic/perirectal invasion and without distant metastasis; grade 2 differentiated tubular tumors predominated. The majority of patients were alive and healthy and about one third had no CRC family history; 52 % of controls were female with mean age of 52 years-old. Half of the ten SNPs (rs6983267, rs4939827, rs4779584, rs961253, rs3802842) significantly associated with CRC risk after correction for multiple tests in most genetic models, whereas two tended to be associated (rs10795668 and rs10411210). rs6983267 had the most significant association, strongest statistical