



Ministério da Saúde

Instituto Nacional de Câncer

Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES GERMINATIVAS NO GENE DA E-CADERINA
(*CDH1*) EM PACIENTES COM CRITÉRIOS CLÍNICOS DE CARCINOMA
GÁSTRICO DIFUSO HEREDITÁRIO**

KAMILA SILVA ALFRADIQUE

Orientador: Dr. Claudio Gustavo Stefanoff

RIO DE JANEIRO

MARÇO - 2013



Ministério da Saúde

Instituto Nacional de Câncer

Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

KAMILA SILVA ALFRADIQUE

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES GERMINATIVAS NO GENE DA E-CADERINA
(*CDH1*) EM PACIENTES COM CRITÉRIOS CLÍNICOS DE CARCINOMA
GÁSTRICO DIFUSO HEREDITÁRIO**

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de
Câncer como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Oncologia

Orientador: Dr. Claudio Gustavo Stefanoff

RIO DE JANEIRO

MARÇO - 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

A392a Alfradique, Kamila Silva.

Análise das alterações germinativas no gene da E-caderina (*CDH1*) em pacientes com critérios clínicos de carcinoma gástrico difuso hereditário. / Kamila Silva Alfradique. – Rio de Janeiro, 2013.

xvi, 89 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2013.

Orientador: Claudio Gustavo Stefanoff.

1. Neoplasias gástricas - genética. 2. Caderinas. 3. Testes genéticos. 4. Mutações. 5. Síndromes Neoplásicas Hereditárias. I. Stefanoff, Claudio Gustavo (orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.994042



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

AUTOR: KAMILA SILVA ALFRADIQUE

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES GERMINATIVAS NO GENE DA E-CADERINA (*CDH1*)
EM PACIENTES COM CRITÉRIOS CLÍNICOS DE CARCINOMA GÁSTRICO DIFUSO
HEREDITÁRIO**

ORIENTADOR: Dr. Claudio Gustavo Stefanoff

Aprovada em: 28/03/2013

EXAMINADORES:

- Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira (Titular)**
- Dr. Fernando Regla Vargas (Titular)**
- Dr. Benedito Mauro Rossi (Titular Externo)**
- Dr. Marcelo Alex de Carvalho (Suplente I)**
- Dra. Cinthya Sternberg (Suplente II)**

RIO DE JANEIRO

2013

A minha família, Humberto, Ormezinda e Raphael, por todo amor e apoio durante
minha trajetória e por sempre respeitarem minhas decisões.

Aos meus avós, Dilcéia e Jurandyr, por sempre me incentivarem a ir em busca dos
meus sonhos e acreditarem que sou capaz.

Ao meu noivo, Daniel da Silva Touça, pelo apoio irrestrito e excepcional
companheirismo mesmo quando estive ausente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça de viver momentos como este.

Aos meus pais, Humberto B. Alfradique e Ormezinda A. da Silva, por me ensinarem a ser uma pessoa de princípios e determinação, lições indispensáveis para qualquer carreira.

Aos meus avós, Dilcéa Braga Tavares e Jurandyr Tavares, por toda confiança que depositaram em mim desde o dia de meu nascimento e por propiciarem condições favoráveis para que eu alcançasse meus objetivos.

Ao meu irmão, Raphael S. de Oliveira, pelo amor, amizade e cumplicidade.

A Daniel da Silva Touça, meu Noivo, pelo carinho, aceitação e maturidade com os quais conduziu meus momentos de estresse ao longo desta jornada.

Aos familiares e amigos que sempre torceram e incentivaram meus projetos.

Ao meu orientador, Dr. Claudio Gustavo Stefanoff, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por tornar possível a realização do mesmo. Obrigada por todos ensinamentos, discussões científicas, pela inspiração profissional e por ser um orientador sempre presente.

À médica endoscopista, Maria Aparecida Ferreira (Serv. de Endoscopia Digestiva do INCA), pela contribuição e atenção que enriqueceram este trabalho.

À enfermeira Ana Lúcia Braga de Faria (Serv. de Endoscopia Digestiva do INCA), pela receptividade e carinho dispensados a mim durante o tempo em que estivemos juntas na coleta de dados clínicos dos pacientes.

À médica patologista, Dra Ivanir Martins de Oliveira (Divisão de Patologia do INCA – DIPAT), pela colaboração e atenção dispensada a este projeto.

À Dra. Maria Theresa Accioly pela contribuição com análises de imunohistoquímica.

Ao Dr. Gabriel Limaverde Soares Costa Sousa (Serviço de Pesquisa Clínica do INCA) pela colaboração com as análises de estrutura cristalográfica da E-caderina.

À coordenação e gerência do Banco Nacional de Tumores (BNT) pela infra-estrutura e coleta de amostras necessárias à execução deste trabalho.

Aos amigos do Grupo Datalinfo, em especial a enfermeira Monik Mariano Pinto, e aos amigos da Pesquisa Clínica, Amanda, Marcos e Natália, pelas produtivas discussões científicas e por gentilmente dividirem comigo seus conhecimentos e espaço físico.

Às agências de fomento: FAPERJ, FAF-INCA, INCA/MS e INCT-CÂNCER.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Kamila Silva Alfradique

E-caderina promove a adesão célula-célula, sendo um componente essencial dos complexos de adesão intercelular. Mutações germinativas do gene da E-caderina (*CDH1*) estão envolvidos na tumorigênese do câncer gástrico difuso hereditário (CGDH). CGDH é uma doença autossômica dominante, que responde por 1% de todos os casos de câncer gástrico (CG). Embora incomum, esta síndrome tem alta penetrância, mau prognóstico (taxa de sobrevivência em 5 anos menor que 10%), idade precoce na apresentação e ferramentas de rastreamento ineficazes. Portanto, a única alternativa para mudar a história natural dessa síndrome é a identificação de pacientes assintomáticos através da detecção precoce de mutações germinativas no *CDH1*. O objetivo deste estudo foi identificar o perfil de alterações germinativas no gene da E-caderina em pacientes com critérios clínicos para CGDH atendidos no Instituto Nacional do Câncer (INCA). Quatorze pacientes que preenchem os critérios clínicos para CGDH (de acordo com os critérios expandidos Brooks-Wilson) foram identificados entre pacientes com câncer gástrico que assinaram consentimento esclarecido aprovado pelo comitê de ética institucional. O DNA genômico foi isolado a partir de amostras de sangue periférico e solicitado à coordenação do Banco Nacional de tumores e DNA (BNT) do INCA. A sequência completa de codificação do *CDH1* incluindo todas as junções íntron/éxon foi amplificado utilizando PCR seguido de sequenciamento direto. Reações de MLPA foram realizadas para todos os casos para pesquisa de grandes deleções e/ou inserções. A técnica de imunohistoquímica foi realizada para avaliar a expressão da proteína E-caderina de todos os pacientes. E para confirmação de uma possível variante polimórfica no éxon 1 do gene *CDH1* o método de análise de fragmentos foi implementado. Alterações germinativas em *CDH1* (mutações pontuais e deleções) foram identificados em quatro de 14 pacientes: um caso de mutação missense no éxon 8 (1037A>C) e três casos de deleção no íntron 1 (48+63-75del). Além disso, cinco polimorfismos, previamente publicados, foram identificados em 7 pacientes (486T>C, 531+10G>C, 933C>G, 1896C>T, 2253C>T). A baixa taxa de mutações detectadas no nosso grupo de pacientes (com critérios clínicos conclusivos de CGDH) sugere que outros genes de susceptibilidade genética possam estar envolvidos na promoção e progressão do CGDH. A identificação dos genes que predispõem ao câncer familiar é um passo essencial para a compreensão da tumorigênese e eventos moleculares subjacentes e é fundamental para o manejo clínico de famílias afetadas.

ABSTRACT

E-cadherin mediates cell–cell adhesion by being an essential component of the intercellular adhesion complexes. Germline mutations of the E-cadherin gene (*CDH1*) are involved in the tumorigenesis of hereditary diffuse gastric cancer (HDGC). HDGC is an autosomal dominant disorder that accounts for 1% of all cases of gastric cancer (GC). Although uncommon, this syndrome has high penetrance, poor prognosis (5-year survival rate of 10%), early age at presentation and ineffective screening tools. Therefore, the only alternative to change the natural history of this syndrome is the identification of asymptomatic patients through early detection of germline mutations in the *CDH1*. The objective of this study was to characterize the profile of E-cadherin germline variants in patients with clinical criteria for HDGC attended at the National Cancer Institute (INCA). Fourteen patients fulfilling clinical criteria for HDGC (according to the expanded Brooks-Wilson criteria) were identified from among gastric cancer patients who signed informed consent approved by the institutional ethics committee. Genomic DNA was isolated from peripheral blood samples requested and the coordination of the National Bank of tumors and DNA (BNT) INCA. The full coding sequence of *CDH1* including all intron/exon junctions was amplified using PCR and screened for mutations by direct sequencing. MLPA reactions were performed for all cases for screening large deletions and / or insertions. The immunohistochemistry technique was performed to assess the expression of the E-cadherin protein in all patients. And for confirmation of a polymorphic variant possible in exon 1 (*CDH1*) fragment analysis was implemented. *CDH1* germline variants (point mutations and deletions) were identified in four of 14 patients: a case of *missense* mutation in exon 8 (1037A> C) and three cases of a deletion in intron 1 (del 48 +63-75). In addition, five polymorphisms, previously published, were identified in 7 patients (48 +6 T>C, 531+10 G>C, 943C>G, 1896C>T, 2253C>T). The low rate of mutations detected in our group of patients (with clinical conclusive CGDH) suggests that other genes genetic susceptibility may be involved in the promotion and progression of CGDH. The identification of genes predisposing to familial cancer is an essential step towards understanding the molecular events underlying tumorigenesis and is critical for the clinical management of affected families.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.1	Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2013 de acordo com o sexo. Exceto pele não melanoma.	1
Figura 1.2	Representação espacial das taxas brutas de incidência, estimadas para o ano de 2013, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas, exceto as de pele não melanoma).	2
Figura 1.3	Taxas de incidência de câncer gástrico de acordo com sexo e área.	4
Figura 1.4	Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasias malignas de estômago, estimadas para o ano de 2013 segundo Unidade da Federação.	5
Figura 1.5	Características histológicas dos subtipos de adenocarcinoma gástrico.	10
Figura 1.6	Domínios da E-caderina.	12
Figura 1.7	Adesão celular mediada por E-caderina.	13
Figura 1.8	Estrutura funcional da E-caderina e distribuição de alterações germinativas identificadas em famílias com CGDH.	17
Figura 3.1	Etapas da técnica de <i>Multiplex Ligation Probe Amplification</i> (MLPA).	32
Figura 4.1	Achados endoscópicos e histopatológicos representativos.	44
Figura 4.2	Avaliação da expressão de E-caderina em CGD	45
Figura 4.3	Variantes polimórficas SNPs identificadas no grupo de pacientes estudados.	46

Figura 4.4	Identificação de deleção intrônica polimórfica 48+63-75del.	46
Figura 4.5	Mutação <i>missense</i> 1037A>C identificada em paciente com ACAS.	47
Figura 4.6	Análise da estrutura cristalográfica da E-caderina e predição das alterações na estrutura proteica acarretada pela mutação <i>missense</i> p.Q346P.	48
Figura 4.7	Análise de grandes deleções e inserções por <i>MLPA</i> .	49

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1.1	Principais características dos tipos histológicos de câncer gástrico.	9
Tabela 1.2	Critérios clínicos para identificação de famílias com CGDH.	15
Tabela 3.1	Principais informações clínicas dos pacientes.	25
Tabela 3.2	Iniciadores usados para a amplificação dos 16 exons do gene <i>CDH1</i> .	28
Tabela 3.3	Sondas MLPA para éxons do gene <i>CDH1</i> .	31
Tabela 4.1	Informações relacionadas ao histórico familiar de câncer dos pacientes com critérios clínicos de CGDH.	37
Tabela 4.2	Tratamento e desfecho dos pacientes com critérios clínicos de CGDH.	41
Tabela 4.3	Características histopatológicas dos pacientes com critérios clínicos de CGDH.	42
Tabela 4.4	Alterações germinativas encontradas no gene <i>CDH1</i> dos pacientes com critérios clínicos de CGDH	43
Tabela 4.5	Frequências genotípicas e alélicas da variante intrônica 48+63-75del na população de doadores voluntários.	43

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ACCAS	Adenocarcinoma pouco diferenciado com células em anel de sinete
ACMD	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado
ACPD	Adenocarcinoma pouco diferenciado
BNT	Banco Nacional de Tumores e DNA
BSA	Do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
CAS	Células em anel de sinete
CCAS	Carcinoma de células em anel de sinete
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CG	Cancer Gástrico
CGD	Câncer gástrico difuso
CGDF	Câncer gástrico difuso familiar
CGDH	Câncer gástrico difuso hereditário
CGF	Câncer gástrico familiar
CGI	Câncer gástrico intestinal
CLM	Câncer lobular de mama
CT	Células-tronco
DAB	Diaminobenzidina
DIPAT	Divisão de Patologia do INCA
EDTA	Do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>

EODGC	Do inglês <i>Early-onset Diffuse Gastric Cancer</i>
GCA	Gastrite crônica atrófica
GP	Gastrectomia parcial
GT	Gastrectomia total
HDGC	Do inglês <i>Hereditary Diffuse Gastric Cancer</i>
IARC	Do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IGCLC	Do inglês <i>International Gastric Cancer Linkage Consortium</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
JA	Junções aderentes
LOVD	Do inglês <i>Leiden Open Variation Database</i>
MAC	Molécula de adesão celular
MI	Metaplasia intestinal
MLPA	Do inglês <i>Multiplex Ligation Probe Amplification</i>
MS	Ministério da Saúde
NCBI	Do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	Do inglês <i>Protein Data Bank</i>
QEpi	Questionários epidemiológicos
WHO	Do inglês <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ESTIMATIVAS DE CÂNCER	1
1.2 CÂNCER DE ESTÔMAGO	2
1.2.1 INCIDÊNCIA	2
1.2.2 ETIOLOGIA	5
1.2.3 SUBTIPOS HISTOLÓGICOS	7
1.3 E-CADERINA	11
1.4 E-CADERINA E CÂNCER	14
1.5 CÂNCER GÁSTRICO DIFUSO HEREDITÁRIO (CGDH)	14
1.5.1 ALTERAÇÕES GERMINATIVAS NO GENE <i>CDH1</i>	16
1.5.2 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E MODELO DE DESENVOLVIMENTO TUMORAL NO CGDH	18
1.5.3 ACONSELHAMENTO GENÉTICO	20
1.5.4 MANEJO CLÍNICO DOS PACIENTES COM CGDH	21
2 OBJETIVOS	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24

3.1	PACIENTES E AMOSTRAS	24
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA E AVALIAÇÃO DE QUALIDADE	26
3.3	AMPLIFICAÇÃO DOS 16 ÉXONS DO GENE <i>CDH1</i>	26
3.4	PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE PCR	27
3.5	SEQUENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISE	29
3.6	ANÁLISE POR <i>MULTIPLEX LIGATION PROBE AMPLIFICATION</i> (MLPA)	30
3.7	ANÁLISE DE FRAGMENTOS	33
3.8	ANÁLISE DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA E-CADERINA E PREDIÇÃO DAS ALTERAÇÕES NA ESTRUTURA PROTEICA ACARRETADA POR MUTAÇÕES PONTUAIS DO TIPO <i>MISSENSE</i>	34
3.9	IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA E-CADERINA	34
4	RESULTADOS	36
4.1	CRITÉRIOS DE CÂNCER GÁSTRICO FAMILIAL E PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	36
4.2	CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS	38
4.3	ACHADOS MOLECULARES	38
4.3.1	VARIANTES POLIMÓRFICAS (SNPS)	38
4.3.2	MUTAÇÃO <i>MISSENSE</i> 1037A>C NO ÉXON 8 DO GENE <i>CDH1</i>	39
4.3.3	ANÁLISE DE GRANDES DE DELEÇÕES POR MLPA	40


5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES	59
7 REFERÊNCIAS	61
8 ANEXOS	75
8.1 CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP-INCA (nº 022/08)	75
8.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	76
8.3 HEREDOGRAMA – PACIENTE 1.	80
8.4 HEREDOGRAMA – PACIENTE 2.	81
8.5 HEREDOGRAMA – PACIENTE 9.	82
8.6 HEREDOGRAMA – PACIENTE 12.	83
8.7 HEREDOGRAMA – PACIENTE 13.	84
8.8 HEREDOGRAMA – PACIENTE 14.	85
8.9 RESULTADOS DA ANÁLISE DE <i>MLPA</i> DE TODOS OS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTIMATIVAS DE CÂNCER

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, WHO) e a IARC (*International Agency for Research on Cancer*) o câncer é uma das principais causas de morte no mundo, sendo responsável por 7,6 milhões de mortes em 2008. Estima-se para o ano 2030, cerca de 13 milhões de mortes por câncer no mundo (WHO, <http://www.who.int/en/>; IARC, <http://www.iarc.fr/>; CURADO MP *et al.*, 2007; BOYLE e LEVIN, 2008; FERLAY J *et al.*, 2010; JEMAL A *et al.*, 2011).

Segundo estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA/MS), se esperam no Brasil, no ano de 2013, a ocorrência de um total de 385 mil novos casos de câncer, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma que será o mais incidente na população brasileira (134 mil novos casos). Para homens, o tumor mais incidente no ano 2013 será o câncer de próstata (60 mil) e em quarto lugar o câncer de estômago (13 mil). Já para mulheres, o mais incidente será o câncer de mama (53 mil) e em sexto lugar o câncer de estômago (cerca de 7 mil) (Figura 1.1) (MS, <http://www.datasus.gov.br/>; INCA, 2011). As taxas brutas de neoplasias malignas para homens e mulheres de acordo com a região brasileira podem ser observadas na Figura 1.2.

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
			Homens	Mulheres	Mama Feminina	52.680	27,9%
Próstata	60.180	30,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Estômago	12.670	6,5%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Estômago	7.420	3,9%
Esôfago	7.770	4,0%			Ovário	6.190	3,3%
Bexiga	6.210	3,2%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Laringe	6.110	3,1%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%					

* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Figura 1.1: Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2013 de acordo com o sexo. *Exceto pele não melanoma. Fonte: www.inca.gov.br.

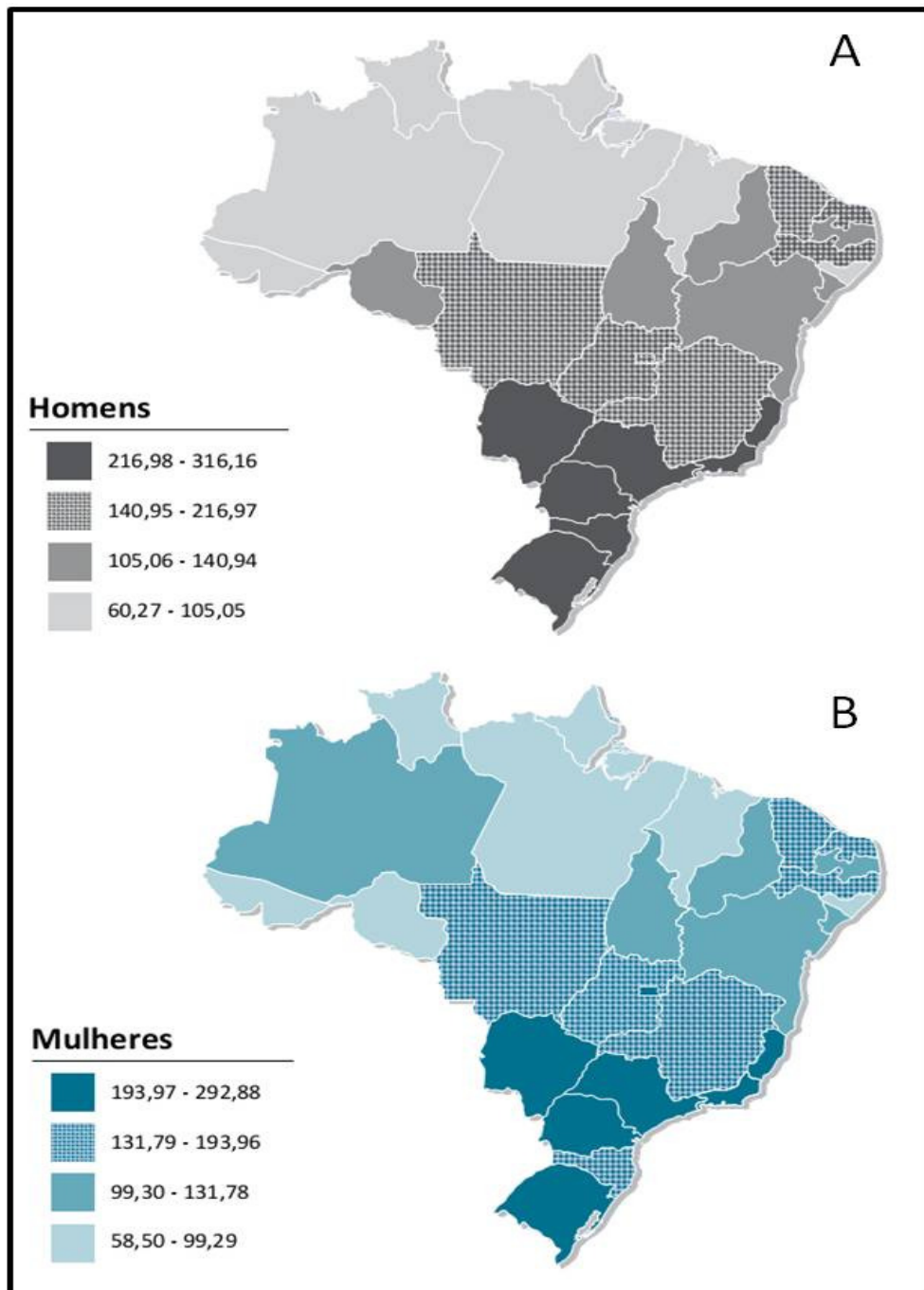


Figura 1.2: Representação espacial das taxas brutas de incidência, estimadas para o ano de 2013, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas, exceto as de pele não melanoma). A: incidência por 100 mil homens; B: incidência por 100 mil mulheres. Fonte: www.inca.gov.br.

1.2 CÂNCER DE ESTÔMAGO

1.2.1 INCIDÊNCIA

Segundo o IARC, o câncer gástrico (CG) é a quarta neoplasia maligna mais comum no mundo e a segunda causa de óbitos relacionados ao câncer (CREW e

NEUGUT, 2006; PRINZ; SCHWENDY e VOLAND, 2006; JEMAL A *et al.*, 2011). As maiores taxas de incidência são observadas no leste da Ásia, Europa Oriental e Central e América do Sul. Baixas incidências estão presentes na África, América do Norte e Sul da Ásia (Figura 1.3) (JEMAL A *et al.*, 2011).

Em 2013, estima-se, para o Brasil, 12.670 casos novos CG em homens e 7.420 em mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CG em homens é o segundo mais frequente nas regiões Norte (11/100 mil) e Nordeste (9/100 mil) e o quarto nas regiões Sul (16/100 mil), Sudeste (15/100 mil) e Centro-Oeste (14/100 mil). Para as mulheres, ocupa a quarta posição na região Norte (6/100 mil), a quinta na região Centro-Oeste (7/100 mil) e a sexta nas regiões Sudeste (9/100 mil), Sul (8/100 mil) e Nordeste (6/100 mil) (MS, <http://www.datasus.gov.br>; INCA, 2011). As taxas brutas de neoplasia maligna do estômago para ambos os sexos de acordo com as regiões brasileiras podem ser observadas na Figura 1.4.

A razão mortalidade/incidência do CG é consideravelmente alta em todas as partes do mundo devido ao mau prognóstico. A sobrevivência relativa em cinco anos é baixa tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos (MS, <http://www.datasus.gov.br>; CREW e NEUGUT, 2006; PRINZ; SCHWENDY e VOLAND, 2006).

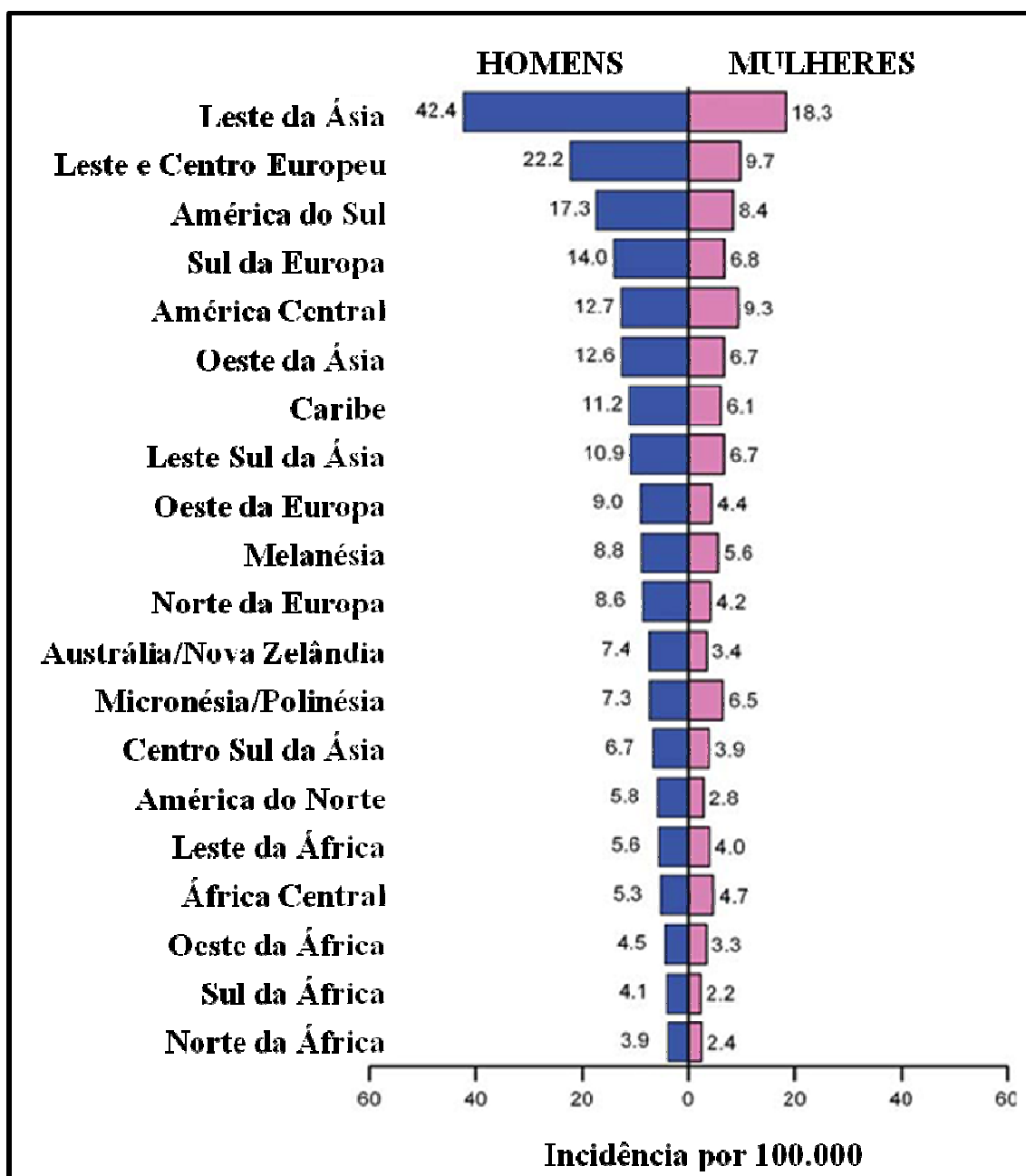


Figura 1.3: Taxas de incidência de câncer gástrico de acordo com sexo e área. Adaptado de: Jemal A *et al.*, 2011.

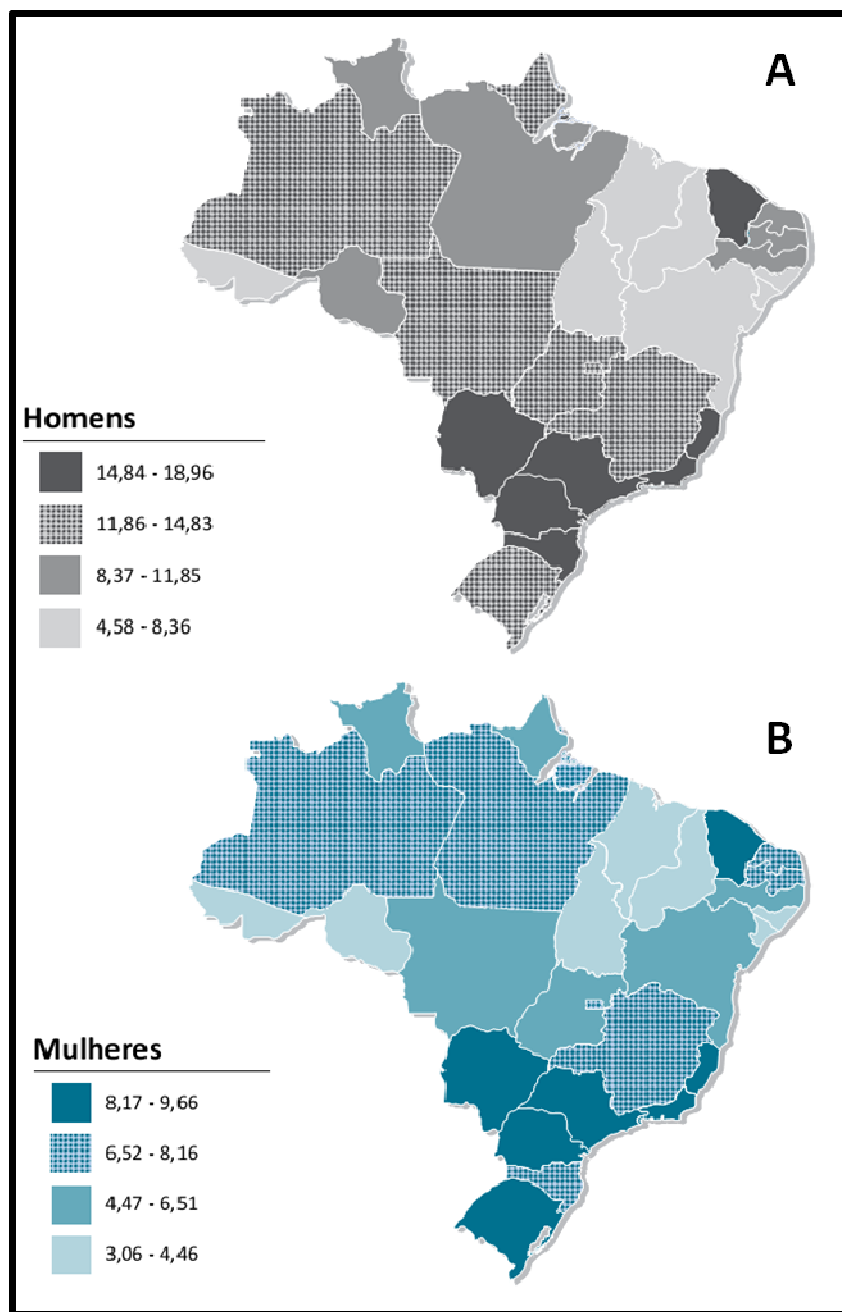


Figura 1.4: Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasias malignas de estômago, estimadas para o ano de 2013 segundo Unidade da Federação. A: incidência por 100 mil homens; B: incidência por 100 mil mulheres. Fonte: www.inca.gov.br.

1.2.2 ETIOLOGIA

O CG é uma doença multifatorial relacionado a interações complexas entre o componente genético do indivíduo e fatores ambientais. Dentre os muitos fatores de risco envolvidos na promoção da carcinogênese, destacam-se a infecção pelo *Heilicobacter pylori* (*H. pylori*), a dieta e o consumo de tabaco (KELLEY e DUGGAN,

2003; LADEIRAS-LOPES R *et al.*, 2008; BOUVARD *et al.*, 2009; BOSMAN FT *et al.*, 2010; GONZALEZ e LOPEZ-CARRILLO, 2010).

Muitos trabalhos demonstraram o modelo de carcinogênese gástrica pela progressão da infecção pelo *H. pylori*, capaz de gerar uma sequência de lesões gástricas desde a gastrite crônica, gastrite atrófica, metaplasia intestinal (lesão considerada pré-maligna), displasia e, por último, adenocarcinoma gástrico (TESTINO; TESTINO e ANCARANI, 2001; SUERBAUM e MICHETTI, 2002; DONG QJ *et al.*, 2012; NOTO JM *et al.*, 2013; PIMENTEL-NUNES P *et al.*, 2013; TSUKAMOTO T *et al.*, 2013). Uma meta-análise de 12 estudos revelou que a infecção com *H.pylori* aumenta em seis vezes o risco de desenvolver CG (HELICOBACTER e CANCER COLLABORATIVE GROUP, 2001). De acordo com a OMS, o bacilo *H. pylori* é classificado como cancerígeno de classe I (WHO, <http://www.who.int>; IARC, <http://www.iarc.fr>). Em países com alta incidência de CG é observada alta prevalência de infecção pelo *H. pylori* (PARK JM *et al.*, 2008). É importante destacar que embora um grande número de indivíduos possua infecção pelo *H.pylori*, apenas uma pequena parcela destes desenvolverá CG.

Além disso, algumas evidências sugerem que a dieta é outro fator de risco importante para o desenvolvimento de GC (BOSMAN FT *et al.*, 2010). Estudos prospectivos têm demonstrado uma redução do risco com o aumento do consumo de frutas e vegetais verdes e que o consumo de alimentos salgados e defumados, por outro lado, poderiam aumentar o risco de desenvolver CG. Portanto ajustes na dieta, como a redução de consumo de sal e aumento na ingestão de frutas e verduras, torna-se um fator importante para a redução da incidência desta neoplasia (POURFARZI F *et al.*, 2009; BASTOS J *et al.*, 2010; BOSMAN FT *et al.*, 2010; COMPARE D *et al.*, 2010; GONZALEZ e RIBOLI, 2010; MURATA A *et al.*, 2010; JAROSZ M *et al.*, 2011; GONZALEZ CA *et al.*, 2012; JEURNINK SM *et al.*, 2012; BONEQUI P *et al.*, 2013). A hipótese de que a alimentação saudável possa ser um fator protetor deve-se ao fato de as frutas e legumes frescos possuírem vitaminas com propriedades antioxidantes, como as vitaminas C, vitamina E e betacaroteno (GONZALEZ CA *et al.*, 2012; JEURNINK SM *et al.*, 2012).

A relação entre o consumo de tabaco e o aumento do risco de CG (principalmente nos tumores localizados na porção inferior do estômago) vem sendo

confirmada também por meio de estudos prospectivos (LADEIRAS-LOPES R *et al.*, 2008; KOIZUMI Y *et al.*, 2004). Uma revisão sistemática de 42 grandes estudos mostraram que o risco de desenvolver CG aumentou 60% no sexo masculino e 20% em mulheres fumantes em comparação com não fumantes (LADEIRAS-LOPES R *et al.*, 2008). Varias evidências sugerem que o consumo de tabaco aumenta o potencial cancerígeno da infecção pelo *H. pylori* (GONZALEZ e LOPEZ-CARRILLO, 2010).

Sobre a associação do risco aumentado de CG com o consumo de álcool, as evidências na literatura ainda são poucas. Alguns estudos apontam uma relação entre a alta ingestão de álcool ao longo da vida e o desenvolvimento de CG em populações bem definidas, mas por outro lado o efeito da exposição ao acetaldeído (produto do metabolismo do álcool no fígado) na promoção do CG não foi confirmada (FRANKE A *et al.*, 2005; BENEDITTI; PARENT e SIEMIATYCKI, 2009; DUELL EJ *et al.*, 2011; EVERATT R *et al.*, 2012; MIKKO S *et al.*, 2012). Os resultados são inconclusivos e por isso estudos adicionais são necessários para fornecer uma avaliação mais detalhada do consumo de álcool associado ao risco de CG.

Em geral, o CG apresenta o fator ambiental/comportamental como o principal para o seu desenvolvimento. Entretanto, alguns estudos mostram que fatores genéticos podem influenciar no desenvolvimento dessa neoplasia. Um exemplo característico é a frequência do CG relacionada ao grupo sanguíneo, a qual é aproximadamente 20% maior em indivíduos pertencentes ao grupo sanguíneo A comparado aos outros grupos sanguíneos (WANG Z *et al.*, 2012; RIZZATO C *et al.*, 2013).

Como estratégias para a prevenção do câncer de estômago, estão incluídas melhorias no saneamento básico e modificações do estilo de vida da população com mudanças de atitudes individuais.

1.2.3 SUBTIPOS HISTOLÓGICOS

O CG pode ser classificado de acordo com o tipo de célula envolvida na transformação maligna. Na maioria dos casos (95%) é classificado como adenocarcinoma (originado a partir de células epiteliais da mucosa). De acordo com

a OMS e a classificação de Lauren, existem dois tipos histológicos principais: subtipo difuso e subtipo intestinal (Figura 1.5) (LAUREN P, 1965; MILNE AN *et al.*, 2009; HUDLER P *et al.*, 2012). As diferenças entre os dois subtipos histológicos de adenocarcinoma gástrico estão demonstradas na Tabela 1.1.

O CG intestinal (CGI) é o subtipo mais frequente, sua incidência é maior nas áreas consideradas de alto risco como o Leste da Ásia, Leste Europeu e América do Sul, e parece estar relacionado a fatores ambientais como tabaco, infecção por *H. pylori* e dieta (particularmente peixes salgados e defumados) (CANEDO; FIGUEIREDO e MACHADO, 2007; MILNE AN *et al.*, 2009; PELETEIRO B *et al.*, 2011; HUDLER P *et al.*, 2012). O CGI mostra componentes glandulares em vários graus de diferenciação e caracteriza-se pelo crescimento expansivo de glândulas moderadamente diferenciadas com escassa secreção de muco. Acredita-se que seu desenvolvimento ocorra por meio de uma progressão de múltiplos passos a partir de uma gastrite crônica atrófica (GCA) seguida por metaplasia intestinal (MI) (LYNCH HT *et al.*, 2005; CARNEIRO F *et al.*, 2008; PARK JM *et al.*, 2008; BOSMAN FT *et al.*, 2010; HUDLER P *et al.*, 2012). O CGI é frequentemente observado em pacientes mais velhos com idade média de 60 anos (a maioria homens) (LYNCH HT *et al.*, 2005; HUDLER P *et al.*, 2012). Os pacientes portadores apresentam uma sobrevida global em 5 anos de 20%, no entanto esta sobrevida pode chegar a 90% se diagnosticado em precocemente (CARNEIRO F *et al.*, 2008; PARK JM *et al.*, 2008).

O CG difuso (CGD) tem distribuição geográfica mais uniforme e está relacionado a um componente genético (CARNEIRO F *et al.*, 2008; PARK JM *et al.*, 2008; MILNE AN *et al.*, 2009; PAREDES J *et al.*, 2012; VOGELAAR IP *et al.*, 2012). É um subtipo composto por células não coesivas, sem a formação de glândulas e muitas vezes são observadas células em anel de sinete (CAS) (Figura 1.5) (OLIVEIRA C *et al.*, 2006; BOSMAN FT *et al.*, 2010; HUDLER P *et al.*, 2012). Caracteriza-se pela falta de adesão entre as células neoplásicas adjacentes, resultando em lesões infiltrativas não associadas a lesões precursoras (GCA e MI) (OLIVEIRA C *et al.*, 2006; CARNEIRO F *et al.*, 2008). O CGD é comumente observado em pacientes mais jovens e acomete igualmente ambos os sexos. A sobrevida global em 5 anos é inferior a 10%, porém se for diagnosticado em estágio precoce, a sobrevida pode chegar a 60% (CARNEIRO F *et al.*, 2008; PARK JM *et al.*, 2008).

Ao longo das últimas décadas estudos comprovaram que o GC resulta de uma complexa interação entre genética e meio ambiente (MILNE AN *et al.*, 2009; HUDLER P *et al.*, 2012). De fato, tem sido bem estabelecido que a promoção e progressão do CG envolve o acúmulo de alterações genéticas relacionadas ao reparo do DNA, adesão celular, transdução de sinal, diferenciação celular, apoptose, entre outros (CARNEIRO F *et al.*, 2008; OLIVEIRA C *et al.*, 2006; CARNEIRO F *et al.*, 2010). Contudo, acredita-se que estes dois subtipos histológicos de CG representem diferentes vias de carcinogênese (PARK JM *et al.*, 2008; CARNEIRO F *et al.*, 2010).

Tabela 1.1: Principais características dos tipos histológicos de câncer gástrico.

CG Intestinal	CG Difuso
Maior incidência em áreas de alto risco	Distribuição geográfica mais uniforme
Crescimento expansivo de glândulas pouco diferenciadas com escassa secreção de muco	Ausência ou redução de adesão entre as células neoplásicas
Associado a lesões precursoras	Não está relacionado a lesões precursoras
Homens são mais acometidos	Ambos os sexos são igualmente acometidos
Mais observado em pacientes mais velhos	Mais comum em pacientes jovens
Sobrevida em 5 anos: 20%	Sobrevida em 5 anos: menor que 10%
Sobrevida em 5 anos (com diagnóstico precoce): cerca de 90%	Sobrevida em 5 anos (com diagnóstico precoce): cerca de 60%

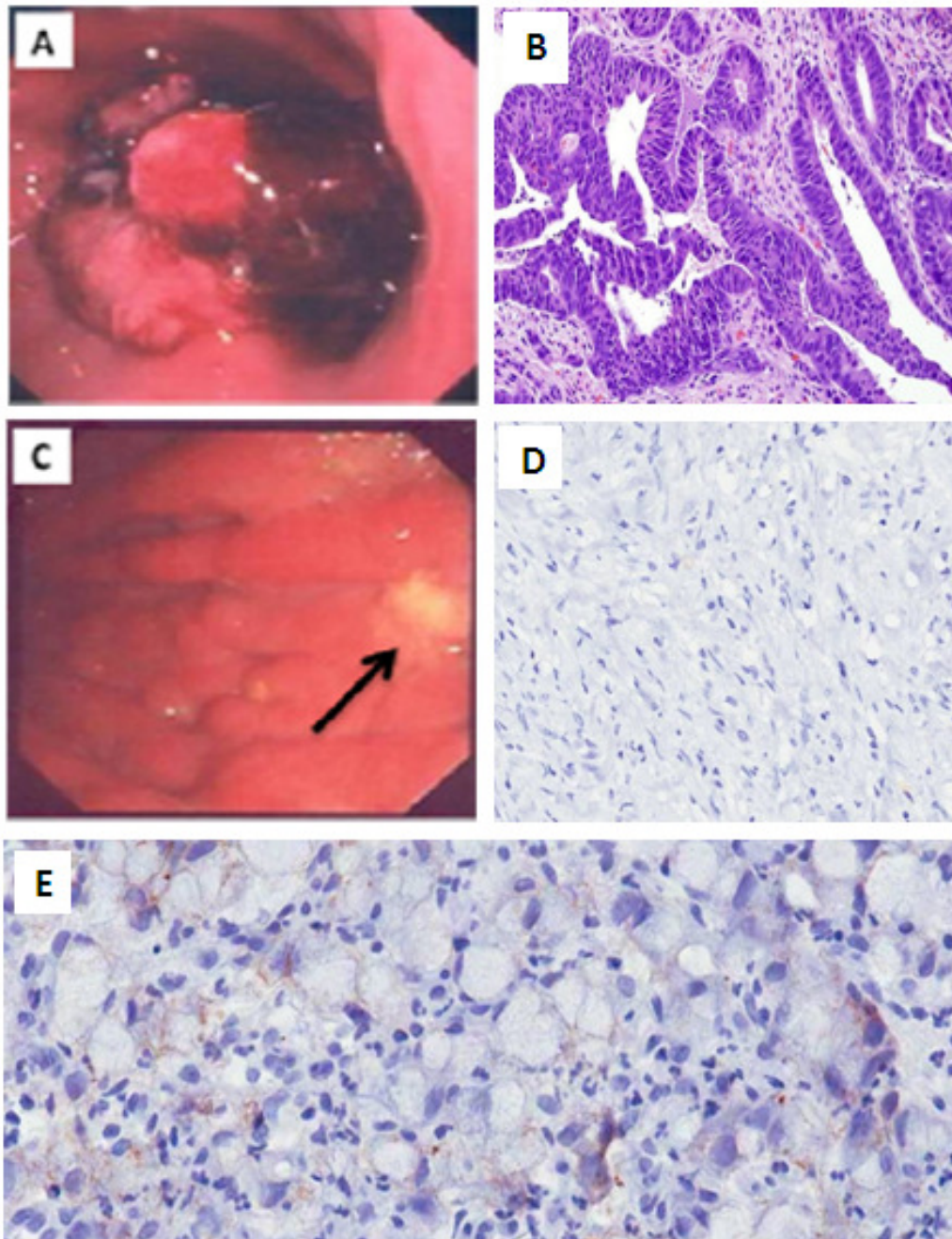


Figura 1.5: Características histológicas dos subtipos de adenocarcinoma gástrico. Adenocarcinoma gástrico intestinal: visão endoscópica em **A** e aspectos histológicos em **B**, mostrando a presença de glândulas tubulares semelhantes às do adenocarcinoma colorretal; Adenocarcinoma gástrico difuso: visão endoscópica em **C** mostrando lesões difusas pálidas características (seta) e visão microscópica em **D**, sem arranjos glandulares e presença de células em anel de sinete. Em **E**, aspectos microscópicos de células em anel de sinete, achado histopatológico comum nos CGDs. As imagens endoscópicas (**A e C**) foram gentilmente cedidas pela médica endoscopista Maria Aparecida Ferreira do Serv. de Endoscopia Digestiva do INCA. As imagens microscópicas (**B, D e E**) foram cedidas pela médica patologista Ivanir Martins de Oliveira (Divisão de Patologia do INCA – DIPAT).

1.3 E-CADERINA

A E-caderina (ou caderina- E) é um protótipo da caderina clássica do tipo I. As caderinas são as principais moléculas de adesão celular (MACs) responsáveis pela adesão célula-célula nos tecidos dos vertebrados (VAN ROY e BERX, 2008; CARNEIRO P *et al.*, 2012). São glicoproteínas transmembranárias dependentes de cálcio e fazem ligações homofílicas, ou seja, as moléculas de uma célula ligam-se a outras moléculas do mesmo tipo nas células adjacentes. Possuem função de formação e manutenção da integridade dos tecidos (VAN ROY e BERX, 2008).

A E-caderina humana é codificada pelo gene *CDH1* (OMIM #192090), que ocupa cerca de 100 kb do DNA genômico localizado no cromossomo 16q22.1. O gene *CDH1* compreende 16 éxons transcritos em um RNAm de 4,5 Kb. Várias evidências sugerem que a perda parcial ou total da função protéica, causada por mutações ou metilação do promotor do gene *CDH1*, pode ter um importante papel no desenvolvimento e progressão do câncer por inibição da adesão celular (STEMMLER MP *et al.*, 2008; VAN ROY e BERX, 2008; HUBBARD TJ *et al.*, 2009).

A E-caderina (120 KDa) é a primeira caderina expressa durante o desenvolvimento dos mamíferos, predominantemente na membrana basolateral das células de epitélios estratificados. É particularmente abundante nas junções aderentes das células epiteliais, onde auxilia a conectar a actina do citoesqueleto cortical das células (adesão célula-célula) (VAN ROY e BERX, 2008).

A adesão celular epitelial é permitida através das interações homofílicas entre as moléculas de E-caderina, primeiramente ocorre interação entre as células adjacentes (ligação-trans) e, em seguida, interação dos domínios citoplasmáticos de diferentes E-caderinas no interior da mesma célula (ligação-cis) (Figura 1.6) (GUMBINER, 2005). A estabilidade desta conformação é conferida pela ligação de cálcio ao complexo (CARNEIRO *et al.*, 2012; GUMBINER, 2005). A glicoproteína possui ainda um importante papel na transdução de sinais, manutenção da polarização, diferenciação da expressão gênica e mobilidade celular (HUMAR e GUILFORD, 2009; BARBER; FITZGERAL e CALDAS, 2006).

A E-caderina possui três componentes principais: peptídeo sinal, constituído de 27 aminoácidos (aa) codificados pelos éxons 1 e 2; peptídeo precursor, constituído de 154 aa codificados pelos éxons 2, 3 e 4; e a proteína “madura”,

contendo 728 aa codificados pelos éxons 4 a 16. O segmento de proteína “madura” tem 3 domínios: um domínio transmembranar (éxons 13 e 14), um domínio intracelular (éxons 14 a 16) e um domínio extracelular (éxons 4 a 13), sendo este último formado por 5 regiões de repetição (*tandem*) nomeadas EC1-EC5, cada uma contendo cerca de 110 resíduos de aminoácidos (Figura 1.7) (SURIANO G *et al.*, 2005; PEDRAZZANI P *et al.*, 2007; CARNEIRO P *et al.*, 2012).

O domínio citoplasmático da E-caderina interage com os filamentos de actina por meio de um grupo de proteínas de ancoramento intracelular conhecidas como cateninas (α , β e γ), essenciais para a eficiente adesão célula-célula (Figura 1.6). O domínio extracelular desempenha um papel fundamental no dobramento correto das proteínas, e no próprio mecanismo de adesão (SURIANO G *et al.*, 2005; PEDRAZZANI P *et al.*, 2007). O complexo caderinas-cateninas está envolvido na sinalização intracelular e a estabilidade necessária deste complexo é conferida pela ligação à catenina p120 (p120ctn) a qual impede que a E-caderina seja degradada via endocítica (VAN ROY e BERX, 2008). Quando o complexo caderinas-cateninas é estável e encontra-se associado aos filamentos de actina é gerado um núcleo de junções aderentes (JA) que é fundamental para inibir a motilidade celular epitelial e manter a arquitetura dos tecidos (DAVID e RAJASEKARAN, 2012; PAREDES J *et al.*, 2012).

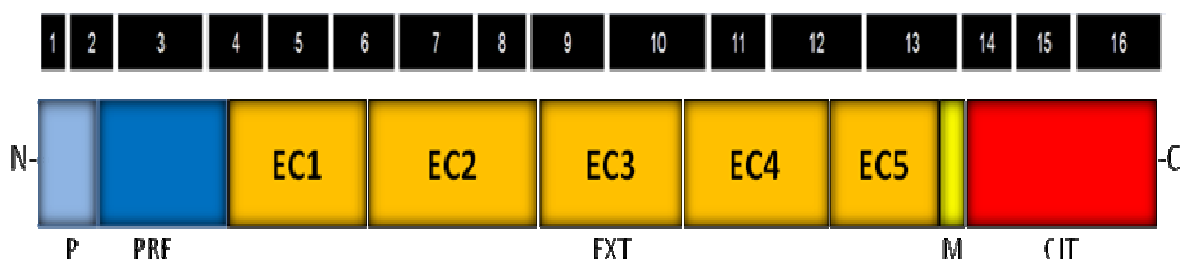


Figura 1.6: Domínios da E-caderina. P: peptídeo sinal; PRE: peptídeo precursor; EXT (EC1– EC5): domínio extracelular; M: domínio transmembranar; CIT: domínio citoplasmático. As caixas pretas superiores representam os 16 éxons do gene *CDH1*.

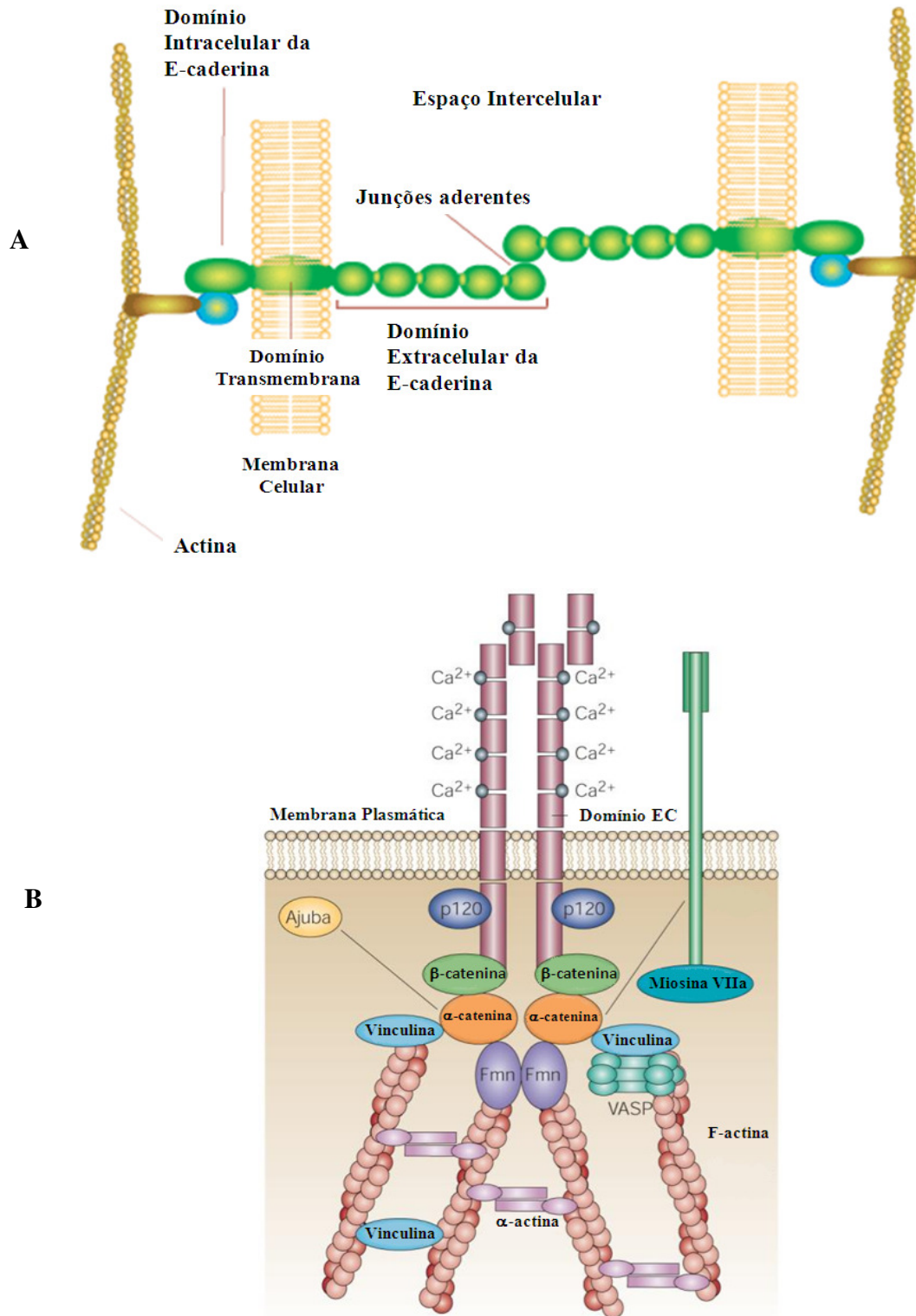


Figura 1.7: Adesão celular mediada por E-caderina. A: interação dos domínios extracelulares. A E-caderina interage de forma homofílica, ou seja, se liga a outra E-caderina de célula adjacente, resultando na formação de dímeros anti-paralelos. B: interação dos domínios citoplasmáticos ao citoesqueleto de actina. O domínio citoplasmático da E-caderina interage com os filamentos de actina por meio de um grupo de proteínas de ancoramento intracelular denominadas cateninas (α , β e γ). Adaptado de KOBIELAK A e FUCHS, 2004; e www.sigmaaldrich.com.

1.4 E-CADERINA E CÂNCER

Alterações genéticas ou epigenéticas no gene *CDH1* podem acarretar em alterações na adesão e estrutura celular, além de alterações de migração e sinalização constituindo um importante potencial oncogênico (VAN ROY e BERX, 2008). A perda funcional de E-caderina é um evento molecular bem estabelecido, que ocorre durante a progressão tumoral, levando a um aumento de invasão de células cancerosas para tecidos vizinhos e metástase (DE WEVER O *et al.*, 2007; RODRIGUEZ FJ *et al.*, 2012).

Variações de expressão da E-caderina foram relatadas no CGD e em outros tumores epiteliais, como mama (subtipo lobular), cólon, pâncreas, tireóide, pulmão e ovário, sugerindo que esta proteína atua como um supressor tumoral em tecidos normais (VAN ROY e BERX, 2008). A expressão da E-caderina também pode variar de acordo com o estágio e grau do tumor. Em geral, nos tumores bem diferenciados, a proteína está fortemente expressa e contribui para um fenótipo menos invasivo, já nos tumores pouco diferenciados e invasivos, sua expressão encontra-se reduzida (GUILFORD P *et al.*, 1998). A redução de expressão da E-caderina, principalmente devido à diminuição de expressão de mRNA, foi considerado como um indicativo de mau prognóstico em vários cânceres (GUILFORD; HUMAR e BLAIR, 2010).

1.5 CÂNCER GÁSTRICO DIFUSO HEREDITÁRIO (CGDH)

A associação do CG com um componente familiar foi relatada em apenas cerca de 10% dos casos de CG, sendo mais comum o carcinoma difuso que o subtipo intestinal (BARBER; FITZGERAL e CALDAS, 2006). Os indivíduos com história familiar de CG e infecção pelo *H. pylori* têm um risco 8 vezes maior para o desenvolvimento de CG que os indivíduos não infectados (BRENNER H *et al.*, 2000). A associação familiar do CG era desconhecida até o reconhecimento da doença na família de Napoleão Bonaparte há cerca de 200 anos, quando, além do imperador, outros membros da família apresentaram CG (o pai dele, o avô paterno, quatro irmãs e um irmão) (LUGLI A *et al.*, 2007).

O CG, em 3% dos casos, está relacionado a síndromes hereditárias. Dentre os casos de CGD, destacamos a principal síndrome familiar de CG e a única associada ao CGD, o Câncer Gástrico Difuso Hereditário (CGDH), responsável por

cerca de 1% dos cânceres gástricos. As primeiras evidências desta síndrome foram relatadas em 1998 por Guilford e col., que identificaram e descreveram pela primeira vez mutações germinativas no *CDH1*, responsáveis pela produção de proteínas truncadas em três famílias Maori com segregação familiar de carcinoma de tipo difuso, associadas a um padrão de transmissão hereditária de tipo autossômico dominante (GUILFORD P *et al.*, 1998).

Tabela 1.2: Critérios clínicos para identificação de famílias com CGDH.

Critérios IGCLC	Critérios expandidos Books-Wilson
1) Dois ou mais casos de CGD em parentes de 1º ou 2º grau, sendo um deles diagnosticado antes dos 50 anos;	1A) Dois ou mais casos de CG, com pelo menos um caso de diagnóstico de CGD antes dos 50 anos;
2) Três ou mais casos de CGD em parentes de 1º ou 2º grau diagnosticados em qualquer idade;	2A) Três ou mais casos de CG, independente da idade, com pelo menos um caso com diagnóstico de CGD;
	3) Casos isolados, com diagnóstico de CGD antes dos 45 anos;
	4) Casos isolados, com diagnóstico de CGD e CLM;
	5) Um membro da família diagnosticado com CGD e outro com CLM;
	6) Um membro da família diagnosticado com CGD e outro com câncer de cólon em anel de sinete.

IGCLC: *International Gastric Câncer Linkage Consortium*; CGD: carcinoma gástrico difuso; CLM: câncer lobular de mama; CG: câncer gástrico. (CALDAS C *et al.*, 1999; BROOKS-WILSON AR *et al.*, 2004; SHAW D *et al.*, 2005)

O diagnóstico do CGDH se baseia no número de familiares acometidos pela doença e a idade no momento do diagnóstico. Em 1999, um workshop composto por geneticistas, gastroenterologistas, cirurgiões, oncologistas, patologistas e biólogos moleculares – o *International Gastric Câncer Linkage Consortium* (IGCLC) - estabeleceu os critérios epidemiológicos de diagnóstico e recomendações para o manejo clínico dos pacientes afetados e seus respectivos familiares. Em 2004, Brooks-Wilson e cols. expandiram os critérios restritivos do IGCLC, propondo

critérios mais abrangentes, atualmente utilizados para identificação desta síndrome (Tabela 1.2) (BROOKS-WILSON AR *et al.*, 2004; SURIANO G *et al.*, 2005; RODRIGUEZ-SANJUAN JC *et al.*, 2006).

1.5.1 ALTERAÇÕES GERMINATIVAS NO GENE *CDH1*

O CGDH é uma síndrome autossômica dominante, não ligada ao sexo, em que os portadores de mutações germinativas no gene *CDH1* apresentam um elevado risco (70 a 85%) para desenvolver CG (PEDRAZZANI C *et al.*, 2007). Recentemente, Kaurah e col. estimaram que o risco acumulativo de portadores de mutações no *CDH1* desenvolverem CG de padrão difuso ao longo da vida é de 40% e 63%, para homens e mulheres, respectivamente (KAURAH P *et al.*, 2007).

Mutações germinativas no gene *CDH1* podem ser detectadas em 30 a 45% dos indivíduos com CGDH. Os relatos incluem famílias européias e asiáticas com CGDH (SURIANO G *et al.*, 2003; SURIANO G *et al.*, 2005; SURIANO G *et al.*, 2006; SCHRADER KA *et al.*, 2008), entretanto ainda não há dados relatados sobre as famílias brasileiras. Até a data, mais de 100 mutações já foram identificadas. O espectro das mutações é bem heterogêneo, não existe um sítio preferencial (“hot spot”) para presença de mutações, as quais incluem substituições de nucleotídeos (do tipo *missense/nonsense*, em regiões de *splicing* ou de reconhecimento de elementos regulatórios), além de pequenas deleções e inserções (Figura 1.8) (BD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk>; CORSO G *et al.*, 2012; OLIVEIRA C *et al.*, 2009b). As mutações *missenses* são as mais comuns em famílias com CGDH (cerca de 30% dos casos), porém o papel patogênico destas mutações ainda não foi completamente determinado e representa um desafio no manejo clínico das famílias com CGDH. Devido à impossibilidade de ponderar as consequências funcionais deste tipo de mutação, ensaios *in vitro* de agregação e invasão celular são atualmente utilizados para determinar o impacto dessas mutações na função da E-caderina e o seu papel na patogênese da síndrome (SURIANO G *et al.*, 2006; SIMÕES-CORREIA, J *et al.*, 2012; FIGUEIREDO J *et al.*, 2013).

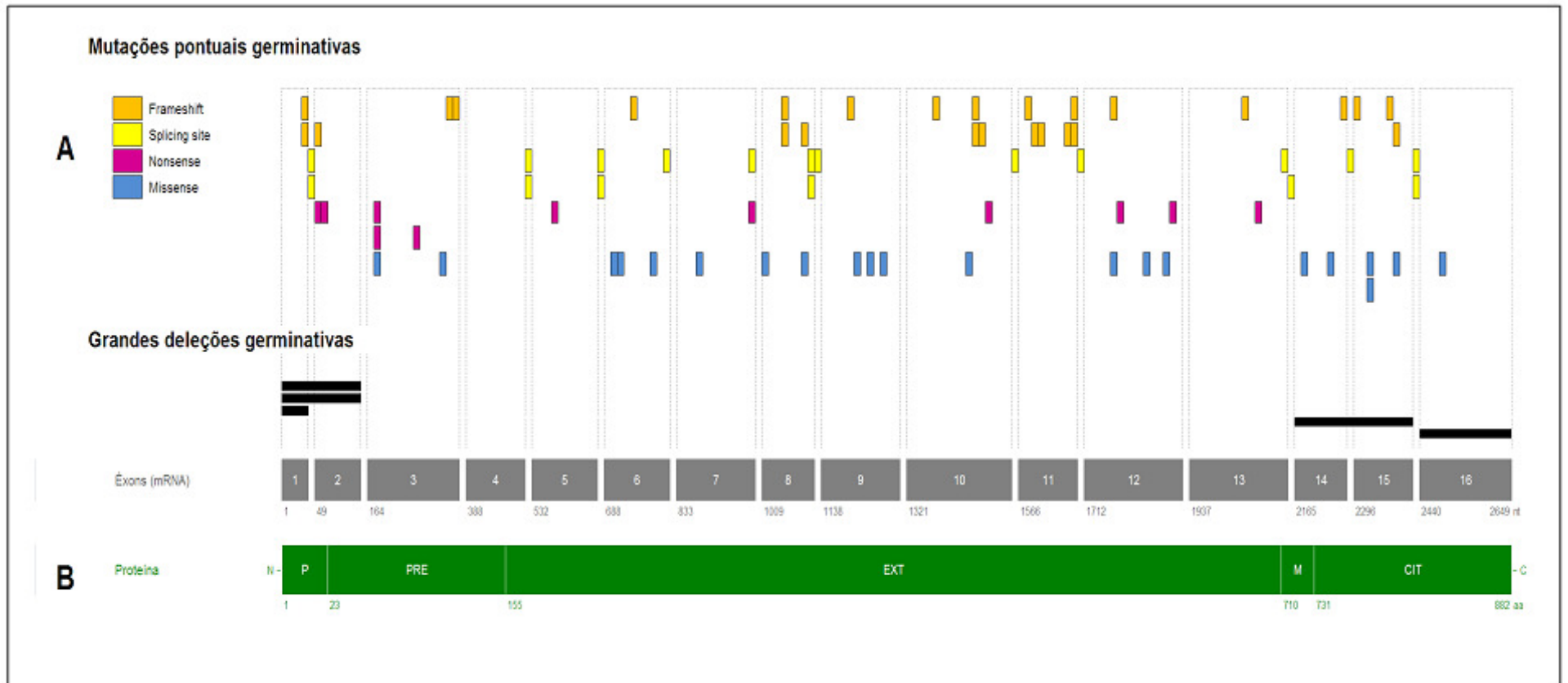


Figura 1.8: Estrutura funcional da E-caderina e distribuição de alterações germinativas identificadas em famílias com CGDH. **A:** Espectro de alterações germinativas identificadas no gene *CDH1* (mutações pontuais, pequenas deleções e inserções e grandes deleções) em relação aos 16 éxons (caixas cinzas); **B:** domínios protéicos da E-caderina (caixas verdes). A proteína E-caderina está formada por: a) peptídeo sinal (P), codificado pelos éxons 1 e parte do éxon 2; b) peptídeo precursor (PRE), codificado por parte do éxon 2, éxon 3 e parte do éxon 4; e c) “proteína madura” de 728 aminoácidos codificados pela última porção do éxon 4 ao éxon 16. Esta última é composta por um domínio extracelular (EXT), um único domínio transmembrana (M) e um domínio citoplasmático (CIT). Adaptado de STEFANOFF e FERREIRA, 2009.

1.5.2 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E MODELO DE DESENVOLVIMENTO TUMORAL NO CGDH

A Síndrome do CGDH caracteriza-se por múltiplos focos de câncer, usualmente pequenos (~1mm de diâmetro), restritos à mucosa gástrica sem envolvimento nodal e formados predominantemente por células em anel de sinete (CAS) mitoticamente inativas mais superficialmente, enquanto na camada mais profunda predominam as células pouco diferenciadas semelhantes às aquelas encontradas no câncer avançado (Figura 1.5 - E). O carcinoma de células em anel de sinete (CCAS) é o achado histopatológico característico em indivíduos portadores de mutações germinativas no gene *CDH1*, submetidos à gastrectomia profilática (CARNEIRO *et al.*, 1999). As lesões maiores (~3 mm) podem conter uma proporção maior de células pouco diferenciadas, estágio em que podem ser detectadas em exames endoscópicos como áreas pálidas características (Figura 1.5 – C).

Os portadores de alterações germinativas no gene *CDH1* geralmente apresentam expressão anormal ou ausente da E-caderina, de acordo com o modelo de duplo evento de Knudson (*two-hit*) de inativação de genes supressores de tumor (KNUDSON AG, 1971). No CGD esporádico a perda de função, pela aquisição de mutações somáticas ou hipermetilação, foi correlacionada com um fenótipo tumoral invasivo (VAN AKEN E *et al.*, 2001). No entanto, no atual modelo proposto para o CGDH, a perda de expressão da E-caderina por inativação somática do alelo *CDH1* selvagem possivelmente tenha um papel patogênico inicial no desenvolvimento tumoral.

Os principais mecanismos envolvidos no segundo evento de inativação do *CDH1* no CGDH incluem mutações somáticas, deleções (perda de heterozigocidade) e silenciamento gênico por hipermetilação do promotor (OLIVEIRA C *et al.*, 2009a; FITZGERALD RC *et al.*, 2010). Destes, a hipermetilação parece ser o fenômeno mais frequente nos estágios iniciais da doença (cerca de 50% dos casos). Recentemente foi demonstrado que cada foco de neoplasia exibe um padrão de metilação único, sugerindo que essas lesões se originam de células precursoras independentes (Humar, B *et al.*, 2009). Provavelmente, os fatores que desencadeiam o segundo evento na mucosa gástrica dos portadores de alterações germinativas no *CDH1* (1º evento) sejam responsáveis pela formação dos focos de CCAS. Os fenômenos fisiológicos e patológicos que poderiam contribuir à

desregulação da E-caderina incluem processos de reparo, infecção por *H. pylori*, processos inflamatórios e hipóxia (PEDRAZZANI C *et al.*, 2007; HUMAR B *et al.*, 2009).

A perda de adesão nas células epiteliais pode acarretar profundas consequências a nível celular, afetando, por exemplo, a polaridade celular e subsequentemente ocasionando um desequilíbrio na divisão celular (simétrica versus assimétrica). Evidências recentes sugerem que algumas neoplasias epiteliais poderiam originar-se a partir de células-tronco (CT) neoplásicas (Al-Hajj M e Clarke MF, 2004). De forma semelhante à contraparte normal, as CTs neoplásicas, podem originar células neoplásicas diferenciadas (por divisões celulares assimétricas) ou incrementar seu número indeterminadamente (por divisões celulares simétricas). Considerando que a E-caderina é essencial para a adesão célula-célula, o estabelecimento da polaridade e a orientação apropriada do fuso mitótico, uma hipótese interessante sugere que a desregulação do gene *CDH1* teria um efeito direto no controle da divisão celular de subpopulações de CTs, representando um mecanismo suficiente para conduzir o desenvolvimento do tumor (HUMAR *et al.*, 2009b). Consistente com esta hipótese acredita-se que o CCAS se origina na zona proliferativa das glândulas gástricas, conhecida como istmo, onde também se localizam as CTs gástricas.

Na tumorigênese do CGDH o foco de carcinoma apresenta-se como células em anel de sinete que quando restrita ao epitélio é considerado um carcinoma *in situ*. Em uma segunda etapa, a perda da polaridade celular (por perda da adesão) poderia ter como consequência a secreção anormal de pepsinogênio sobre a membrana basal, facilitando assim a invasão da lamina própria. As células em anel de sinete permanecem inativas na lâmina própria por um período ainda indeterminado e nem todas irão progredir inexoravelmente para o carcinoma invasor além da muscular da mucosa (HUMAR e GUILFORD, 2009).

Exames microscópicos de CGDH estágio T2 sugerem que a progressão além da mucosa gástrica se correlaciona com a aquisição de um fenótipo de células neoplásicas pobremente diferenciadas. Estas células se caracterizam pela expressão da quinase Src (envolvida na indução da transição epitélio-mesenquimal e do fenótipo tumoral invasivo), FAK, STAT3, fibronectina (marcador mesenquimal), MMP-2 e MMP-9 (HUMAR B *et al.*, 2009; HUMAR e GUILFORD, 2009). Estes

achados mostram que, embora a desregulação da E-caderina seja um evento crucial nos estágios iniciais da doença (CCAS restringido à mucosa) não é determinante para a progressão a submucosa gástrica. Pouco se sabe sobre os fenômenos que poderiam desencadear a ativação da quinase Src e induzir a transição epitelio-mesenquimal. No CGD esporádico a transição entre CCAS e o carcinoma difuso avançado parece estar correlacionada com ampliações gênicas da região 20q (*SRC*), entretanto isto não foi reproduzido no CGDH. Teorias alternativas sugerem o silenciamento de inibidores da Src por metilação e/ou mecanismos decorrentes das condições locais de hipóxia (HUMAR e GUILFORD, 2009)

1.5.3 ACONSELHAMENTO GENÉTICO

A penetrância do CGDH (proporção de indivíduos portadores da mutação germinativa no *CDH1* que manifestam o desenvolvimento do CGD) é incompleta. Foi sugerido que o tipo e a localização das mutações germinativas no *CDH1* pudessem alterar os valores de penetrância da síndrome (SHAW D *et al.*, 2005). A média de idade do diagnóstico no CGDH é de 38 anos, variando de 30 a 50 anos, mas também já foram descritos casos em adolescentes e em pacientes idosos (CALDAS C *et al.*, 1999).

O prognóstico desta doença é ruim, a sobrevida em 5 anos é inferior a 10%. Portanto, é recomendado que as famílias que preencherem os critérios clínicos de CGDH sejam encaminhadas para um serviço de aconselhamento genético (BLAIR VR, 2012).

Uma avaliação psicológica (pré e pós-teste molecular) é imprescindível, a fim de verificar se o indivíduo é capaz de se adequar aos riscos futuros frente a um resultado positivo. Atualmente existem controvérsias em relação à abordagem das famílias com CGDH, especialmente no que diz respeito ao melhor momento da realização do teste genético e aos aspectos psicológicos e manejo clínico (medidas terapêuticas preventivas) do familiar portador de uma mutação. Uma vez identificada uma mutação germinativa, o teste genético é frequentemente oferecido a familiares a partir dos 16 anos, idade onde o risco de desenvolver um CGD sintomático é menor que 1% (KLUIJT I *et al.*, 2011; BLAIR VR, 2012; CORSO; MARRELLI e ROVIELLO, 2012). No entanto, o teste pode ser oferecido a familiares mais novos,

levando em conta a severidade da história familiar e a maturidade do indivíduo (GUILFORD P *et al.*, 2007; SERENO M *et al.*, 2011).

Além do CGD, o CLM é a única neoplasia observada com alta frequência em famílias com CGDH (BROOKS-WILSON AR *et al.*, 2004; SURIANO G *et al.*, 2005; KAURAH P *et al.*, 2007; SCHRADER KA *et al.*, 2008). A penetrância estimada do CLM para mulheres portadoras de mutações no *CDH1* varia entre 40 e 55% (KAURAH P *et al.*, 2007). O consenso nesses casos é oferecer protocolos de monitoramento para o CLM baseados na experiência com famílias portadoras de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, recomendando exames clínicos semestrais e mamografias anuais combinados com ultrassonografias e exames por ressonância magnética para mulheres acima de 35 anos (SERENO M *et al.*, 2011; HERRÁIZ M *et al.*, 2012). A mastectomia profilática também pode ser uma opção para mulheres com mutação no *CDH1*, especialmente com diagnóstico prévio de CLM unilateral ou com múltiplos achados clínicos anormais, por biópsia (SCHRADER KA *et al.*, 2008).

1.5.4 MANEJO CLÍNICO DOS PACIENTES COM CGDH

O comportamento agressivo do CGD determina que o diagnóstico seja realizado em um estágio avançado da doença. Devido a isso, o manejo clínico adotado para o CGDH se baseia na identificação pré-sintomática de portadores de mutações no gene *CDH1*, seguido de gastrectomia profilática ou monitoramento endoscópico. Uma vez o câncer detectado recomenda-se a gastrectomia terapêutica (MASTORAKI A *et al.*, 2011).

A gastrectomia profilática tem sido fortemente recomendada para portadores assintomáticos, como opção preventiva para o desenvolvimento ou expansão do tumor (KLUIJT I *et al.*, 2011; MASTORAKI A *et al.*, 2011; BLAIR VR, 2012). Esta conduta leva a uma melhor sobrevida dos pacientes, mas possui um risco de mortalidade e uma alta morbidade que necessitam ser ponderados. Considerando a baixa idade dos pacientes com CGDH e os avanços nos procedimentos cirúrgicos e nos cuidados pós-operatórios, atualmente o risco cirúrgico estimado é de aproximadamente 1% (BLAIR VR *et al.*, 2006). Baseado nos dados disponíveis de penetrância, o risco de desenvolver CGD sintomático em um portador de mutação com 20 anos de idade é de 1% e de 4% aos 30 anos (HERRÁIZ M *et al.*, 2012). Por

outro lado, a gastrectomia total resulta em deficiência permanente de vitamina B12 e má absorção das vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), ácido fólico, cálcio e ferro. Apesar dos escassos dados disponíveis, é provável que a gastrectomia tenha um impacto negativo no crescimento e desenvolvimento de pacientes adolescentes. Desta forma, este procedimento operatório usualmente não é oferecido aos portadores de mutações menores de 18 anos (GUILFORD P *et al.*, 2007). Contudo, esta intervenção cirúrgica preventiva é discutida individualmente com cada paciente para que os mesmos sejam esclarecidos quanto aos riscos e benefícios. Também é levado em consideração o risco de câncer idade-específica, as taxas de morbidade e mortalidade e a possibilidade de câncer extragástrico.

Para portadores de mutações assintomáticos não submetidos à cirurgia profilática, é recomendado um acompanhamento clínico de 6 a 12 meses, que inclui esôfago-duodenoscopia com biópsia direta, ultrassonografia endoscópica e cromo endoscopia (exame endoscópico da superfície da mucosa após instilação de substâncias corantes, capaz de aumentar a aptidão para diferenciar e distinguir pequenas alterações epiteliais). Caracteristicamente, o CGD cresce por baixo da mucosa aparentemente normal, especialmente nos estágios iniciais e podem ser detectados como áreas pálidas, muitas vezes realçadas pela utilização de corantes (SHAW D *et al.*, 2005). A vigilância endoscópica não está isenta de risco e a decisão sobre o monitoramento endoscópico deve ser tomada em conjunto com uma equipe de aconselhamento genético. Os pacientes são informados claramente a respeito dos riscos desta alternativa e caso optem pela vigilância endoscópica, são instruídos para minimizar a exposição a fatores de risco para CG (MASTORAKI A *et al.*, 2011).

O CGDH é uma síndrome relativamente rara, com cerca de 100 famílias identificadas de péssimo prognóstico, decorrente do estágio avançado em que a doença é diagnosticada. Portanto, a única forma do controle da doença é a identificação de familiares com o gene *CDH1* mutado, o que permite que medidas preventivas sejam adotadas, modificando a história natural da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- Identificar e caracterizar as alterações germinativas no gene da E-caderina (*CDH1*) em pacientes com critérios clínicos de CGDH matriculados no Instituto Nacional do Câncer (INCA).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar e sequenciar, a partir de DNA de sangue periférico de pacientes com critérios clínicos de CGDH, os 16 éxons do gene *CDH1* para pesquisa de mutações pontuais e/ou pequenas deleções germinativas.
- Investigar a ocorrência de grandes deleções e/ou duplicações germinativas no gene *CDH1*, a partir de DNA de sangue periférico de pacientes com critérios clínicos de CGDH.
- Avaliar a expressão da E-caderina por imuno-histoquímica em CGD de pacientes com critérios clínicos de CGDH.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PACIENTES E AMOSTRAS

Este trabalho forma parte do projeto “Implantação do grupo interdisciplinar de estudo em câncer gástrico difuso hereditário – Análise de mutações germinativas no gene *CDH1* em indivíduos com câncer gástrico difuso hereditário”, sob a responsabilidade da Dra. Maria Aparecida Ferreira, Serviço de Endoscopia Digestiva, Hospital de Câncer I, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INCA, sob o nº 022/08 (Anexo 1), que tem por objetivo caracterizar o perfil clínico e molecular de pacientes portadores de câncer gástrico com critérios clínicos para CGDH matriculados no Serviço de Cirurgia Abdomino - Pélvica do Instituto Nacional de Câncer.

Foram incluídos nesse estudo, 14 pacientes matriculados no Serviço de Cirurgia Abdomino - Pélvica do Instituto Nacional de Câncer no período de janeiro de 2008 a até julho de 2012 apresentando algum dos critérios clínicos expandidos para CGDH (BOOKS-WILSON *et. al*, 2004):

- 1A) Dois ou mais casos de CG, com pelo menos um caso de diagnóstico de CGD antes dos 50 anos;
- 2A) Três ou mais casos de CG, independente da idade, com pelo menos um caso com diagnóstico de CGD;
- 3) Casos isolados, com diagnóstico de CGD antes dos 45 anos;
- 4) Casos isolados, com diagnóstico de CGD e CLM;
- 5) Um membro da família diagnosticado com CGD e outro com CLM;
- 6) Um membro da família diagnosticado com CGD e outro com câncer de cólon em anel de sinete.

Para atender este projeto, foram coletadas amostras de sangue periférico (4 mL com anticoagulante EDTA) de acordo com a logística do Banco Nacional de Tumores e DNA (BNT-INCA), conforme a rotina recomendada pelo CEP/INCA. Estas amostras foram registradas no sistema informatizado do BNT e identificadas apenas com códigos de barras, no intuito de se preservar o anonimato do paciente. Após a assinatura Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico do projeto (TCLE, Anexo 2) que autoriza a realização dos testes genéticos e demais estudos

moleculares com amostras de DNA, amostras de DNA extraído de sangue periférico destes probandos foram solicitadas ao BNT.

As informações clínicas e histopatológicas do diagnóstico e do acompanhamento, tratamento e desfecho foram coletadas diretamente de prontuários médicos físicos e de sistemas eletrônicos do INCA. O histórico familiar de câncer foi obtido das informações contidas no Questionário Epidemiológico (QEpi) do BNT/INCA e a partir de entrevistas pessoais com os probandos e/ou familiares. Esta parte do trabalho foi realizada sob a orientação da médica endoscopista Maria Aparecida Ferreira (Serviço de Endoscopia Digestiva/HC1-INCA). As demais características dos pacientes estão listadas na Tabela 3.1 (BROOKS-WILSON *et al*, 2004). Os heredogramas foram elaborados utilizando o programa SmartDraw® Trial version (Disponível em <http://www.smartdraw.com>)

Tabela 3.1: Principais informações clínicas dos pacientes.

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Diagnóstico histopatológico	Critério clínico para CGDH ¹
1	M	29	ACAS	1A e 3
2	F	29	ACAS	3
3	M	24	ACAS	3
4	F	43	AMS	3
5	F	42	ACAS	3
6	F	29	ACAS	3
7	F	32	ACAS	3
8	M	31	ACAS	3
9	F	38	ACAS	3 e 5
10	F	36	ACAS	3
11	F	21	ACAS	3
12	M	53	ACAS	2A
13	F	68	ACPD	2A
14	F	73	ACMD	2A

ACPD: adenocarcinoma pouco diferenciado; ACAS: adenocarcinoma pouco diferenciado com células em anel de sinete; ACMD: adenocarcinoma moderadamente diferenciado; AMS: adenocarcinoma pouco diferenciado com células muco secretora; ¹Critérios clínicos expandidos de Brooks-Wilson e cols. (2004)

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA E AVALIAÇÃO DE QUALIDADE

As amostras de DNA utilizadas nas análises moleculares deste trabalho foram extraídas a partir de 200 µL de sangue periférico dos 14 pacientes com critérios clínicos de CGDH e de 200 doadores voluntários de sangue do Serviço de Hemoterapia do INCA (grupo controle). Foram utilizados os conjuntos de reagentes comerciais *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen®) ou, alternativamente, o *MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I* (Blood), utilizando a plataforma automatizada de extração de ácidos nucleicos *MagNA Pure LC* (Roche Applied Science®) de acordo com as recomendações dos fabricantes.

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro ND1000 (NanoDrop Technologies®). A leitura foi realizada no comprimento de onda de (λ) 260 nm para ácidos nucleicos e 280 nm para proteínas. A pureza das amostras foi estimada em relação à razão 260/280. Valores entre 1,7 e 2,0 foram considerados com grau de pureza satisfatório. Amostras concentradas foram diluídas com água livre de nuclease para uma concentração final em torno de 20 ng/µL. A média de rendimento de DNA extraído a partir de amostras de sangue periférico (200 µL) dos pacientes incluídos neste estudo foi de aproximadamente 50 ng/µL. A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em géis de agarose a 0,8% em tampão TBE (45mM TRIS, 45mM de ácido bórico, 1mM EDTA, pH 8,0) contendo 0,1mg/mL de brometo de etídio (Invitrogen®), utilizando como referencial o marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen®).

3.3 AMPLIFICAÇÃO DOS 16 ÉXONS DO GENE *CDH1*

As reações de PCR foram padronizadas para amplificar cada um dos 16 éxons do gene *CDH1*, incluindo as junções íntron-éxon, utilizando condições previamente publicadas e algumas adaptações (BROOKS-WILSON *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2006).

Todas as reações de PCR foram otimizadas para um volume final de 50 µL. Devido alto conteúdo em nucleotídeos GC (~72%), o éxon 1 do gene *CDH1* foi amplificado com o tampão de PCR *Colorless GoTaq® Flexi Buffer* (pH 8,5) (Promega®), 1,0 U de enzima *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega®) e 0,2 mM de MgCl₂. Para amplificação dos demais éxons utilizou-se 1,0 U de enzima *Platinum®*

Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen®), com tampão de PCR (600 mM Tris SO₄, 180 mM (NH₄)₂SO₄, pH 8,9, Invitrogen®) e 2,0 mM de MgSO₄. Em todas as reações de PCR adicionou-se 0,2 mM de dNTP (uma mistura de dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 10 pmol/μL de oligonucleotídeos iniciadores (MWG Operon®), 20 ng/μL de amostra de DNA e água deionizada estéril para completar o volume da reação. As reações de PCR foram realizadas em termocicladores *Veriti® 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems™) e incluiu-se, em todos os casos, controles negativos (sem DNA). As reações de PCR foram avaliadas por eletroforeses em gel de agarose 1,5% em tampão de TBE (Tris Base a 45 mM, ácido Bórico a 45 mM e EDTA a 1mM) contendo 0,1mg/mL de brometo de étideo. A lista de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de cada éxon, assim como suas respectivas temperaturas de hibridação (*anealing*) e o tamanho esperado dos produtos se encontram listados na Tabela 3.2.

3.4 PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE PCR

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o conjunto de reagentes *GKX PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Biosciences®) ou o conjunto de reagentes *HiYield™ Gel/PCR DNA Mini Kit* (Real Genomics™/Real Biotech Corporation®) de acordo com as recomendações do fabricante. O volume total da reação de PCR foi transferido para uma coluna (tubo com filtro) acoplada ao tubo coletor contendo 500 μL do tampão de captura ("*Capture Buffer*"). A mistura foi homogeneizada e centrifugada em temperatura ambiente, a máxima velocidade (13000 rpm), por 1 minuto. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e adicionou-se 500 μL do tampão de lavagem ("*Wash Buffer*", reagente comercial *GKX PCR DNA* ou *HiYield™ Gel/ PCR DNA Mini Kit*). Após outra centrifugação, o tubo coletor foi desprezado e a coluna acoplada em novo tubo de 1,5 μL. Com a finalidade de recuperar o DNA retido no filtro, 30 μL do tampão de eluição ("*Elution Buffer*") foram aplicados sobre o centro da matriz da coluna e, após 3 minutos, centrifugou-se o tubo por 13000 rpm por 2 minutos. Os produtos purificados foram coletados em microtubos e armazenados a -20 °C até o uso. Antes de serem utilizados na técnica de sequenciamento, 1 μL dos produtos purificados foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 2%.

Tabela 3.2: Iniciadores usados para a amplificação dos 16 exons do gene *CDH1*

Ex	Iniciador	Sequência (5'-3')	TH	TP	Referência
1 ¹	CDH-1Fa	GTGAACCTCAGCCAATCAG	63°C	357	BROOKS-WILSON e cols, 2004
	CDH-1Ra	TGACGACGGGAGAGGAAG			
	CDH-1Fb	GGTGAACCTCAGCCAAT	58°C	372	Desenhado durante este estudo ²
	CDH-1Rb	AAGAAGGGAAGCGGTGAC			
	CDH-1Fc	TGCCTCCGGGCTCACCT	63°C	311	ZHANG e cols, 2006
	CDH-1Rc	AGAGGAAGGGGCGCAGGG			
2 ¹	CDH-2Fa	TGTTGGTTTCGGTGAGCAG	61°C	261	BROOKS-WILSON e cols, 2004
	CDH-2Ra	GGTGTGGGAGTGCAATTTCT			
	CDH-2Fb	GCTGTTGGTTTCGGTGAG	58°C	260	Desenhado durante este estudo ²
	CDH-2Rb	GTGGGAGTGCAATTTCTCG			
3	CDH-3F	CGCTCTTTGGAGAAGGAATG	58°C	376	BROOKS-WILSON e cols, 2004
	CDH-3R	AACGGTACCAAGGCTGAGAA			
4	CDH-4F	GCTGTCTGGCTAGGTTGGAC	58°C	297	BROOKS-WILSON e cols, 2004
	CDH-4R	TTTTCCCTTTCTCCTTGG			
5	CDH-5F	GAAAGGGAAAAGACCCAGTG	58°C	298	BROOKS-WILSON e cols, 2004
	CDH-5R	GGATCCAGCATGGGTTGAC			
6	CDH-6F	GCCCCTTCTCCCATGTTT	56°C	287	BROOKS-WILSON e cols, 2004
	CDH-6R	CTTTGGGCTTGGACAACACT			
7	CDH-7F	GGGCAGAATTGGATTAAGCA	57°C	321	BROOKS-WILSON e cols, 2004
	CDH-7R	TGTCCACGGGATTGAGCTA			
8	CDH-8F	CTGGGCTAGGCCAAAGGT	57°C	272	BROOKS-WILSON e cols, 2004
	CDH-8R	CCATGAGCAGTGGTGACACTT			
9	CDH-9F	AATCCTTTAGCCCCCTGAGA	61°C	326	BROOKS-WILSON e cols, 2004
	CDH-9R	AGGGGACAAGGGTATGAACA			
10	CDH-10F	CCAAAAGCAACAGTTAAGGA	56°C	433	BROOKS-WILSON e cols, 2004
	CDH-10R	CAAATGACAAAATGCCATGA			
11	CDH-11F	AGCGCTTAAGCCGTTTTCA	60°C	284	BROOKS-WILSON e cols, 2004
	CDH-11R	GAGGGGCAAGGAAGTGAAGT			
12	CDH-12F	AAGGCAATGGGGATTGATTA	59°C	363	BROOKS-WILSON e cols, 2004
	CDH-12R	ATTGAAAGGTGGGGATCTGG			
13	CDH-13F	CAATTTTATTCTGGAATGAGCTTTT	55°C	364	BROOKS-WILSON e cols, 2004
	CDH-13R	CAGGAAATAAACCTCCTCCATTT			
14	CDH-14F	GCTGCTTCTGGCCTTCTTTA	55°C	281	BROOKS-WILSON e cols, 2004
	CDH-14R	GCTGTTTCAAATGCCTACCTCT			
15	CDH-15F	TGAACATAGCCCTGTGTGTATG	58°C	282	BROOKS-WILSON e cols, 2004
	CDH-15R	TTTTTGACACAACCTCCTCTG			
16	CDH-16F	AGACTTCTTGCCCCAGATGA	63°C	348	BROOKS-WILSON e cols, 2004
	CDH-16R	AACCACCAGCAACGTGATTT			

E: éxons do gene *CDH1*; F: para cada iniciador, indica “forward” (sentido); R: para cada iniciador, indica “reverse” (anti-sentido); TH: temperatura de hibridação dos iniciadores; TP: tamanho esperado de cada região amplificada em pares de bases (pb) ¹Diferentes pares de iniciadores foram empregados para otimizar as reações de PCR dos éxons 1 e 2. ²Foram utilizados os programas Primer3 (v. 0.4.0) (disponível em <http://frodo.wi.mit.edu/>) e Primer-BLAST (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

3.5 SEQUENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISE

Todos os éxons do gene *CDH1*, incluindo as junções íntron-éxon foram sequenciados. As reações de sequenciamento foram baseadas em métodos de marcação dos terminadores (ddNTPs). Para isto foi utilizado um sequenciador automático de capilar ABI 3130xl (Applied Biosystems®) de acordo com os protocolos estabelecidos para o conjunto de reagentes *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems®).

As reações foram realizadas em placas de 96 poços *MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate* (Applied Biosystems®) para um volume final de 10 µL. Foram adicionados 1,0 µL de tampão comercial “*BigDye*” e 1,5 µL de tampão de sequenciamento 5x (*BigDye®*; Applied Biosystems®) junto a uma quantidade pré determinada de DNA (4 - 5 µL) e os respectivos iniciadores *sense (forward)* e *antisense (reverse)* a uma concentração final de 1,0 pmol/µL. As reações de sequenciamento consistiram em 40 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. A precipitação foi realizada pela adição 30 µL de isopropanol 75% em cada poço da placa. Após ser homogeneizada por 10 segundos e mantida protegida da luz, em repouso, por 15 minutos, a placa foi centrifugada a máxima velocidade por 45 minutos. Descartou-se o sobrenadante e 50 µL de Etanol 75% (Merck®) foram acrescentados em todos os poços. A placa foi novamente centrifugada, o remanescente descartado por rápida centrifugação invertida e a placa deixada em um bloco aquecido à 60°C, durante 10 minutos, sob abrigo da luz. O DNA foi ressuspenso em 10 µL de formamida HiDi (Applied Biosystems®). Os produtos foram avaliados em duplicata em ambas direções.

A coleta de dados foi realizada com auxílio do programa *Sequence DNA Analysis System*. Para a análise das sequências foi utilizado o programa *Mutation Surveyor®* (SoftGenetics®). As sequências obtidas foram comparadas com sequências padrões e com as sequências que se encontram depositadas em bancos de dados (<http://www.cbs.dtu.dk/services/netgene2>; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, Accession number DQ090940) para o gene *CDH1* (OMIM#192090). Para checagem de polimorfismos foram consultadas as bases de dados <http://www.genecards.org/> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

3.6 ANÁLISE POR MULTIPLEX LIGATION PROBE AMPLIFICATION (MLPA)

Esta metodologia foi utilizada com o objetivo de pesquisar grandes deleções e/ou duplicações no gene *CDH1*, não detectáveis pelo sequenciamento direto. Foi utilizado o conjunto de reagentes comerciais SALSA P083-C1 *CDH1* MLPA (MRC-Holland®). Seguindo as recomendações do fabricante a técnica foi otimizada previamente, utilizando DNA genômico de sangue periférico de dez doadores voluntários extraídos com diferentes metodologias e controles negativos (sem DNA) no intuito de definir melhores parâmetros de estocagem, concentração e quantidade de amostras, tempo de hibridação de sondas e métodos de normalização de dados.

As alíquotas de DNA (5 µL) diluídas em tampão TE (10 mM Tris HCl e 0.1 mM EDTA; pH= 8,2) foram desnaturadas a 98°C por 5 minutos. A etapa de **hibridização de sondas** (Figura 3.1- A) foi iniciada com adição de 3 µL de mix de sondas (SALSA *Probe-mix* e *MLPA buffer* – reagente comercial SALSA P083-C1 *CDH1* MLPA – Tabela 3.3) seguida de incubação a 60°C por 17 horas. Para a etapa de **reação de ligação de sondas** (Figura 3.1 -B) foi preparado um mix de enzimas (*Ligase-65 buffer A*, *Ligase-65 buffer B*, *Ligase-65* - reagentes comerciais SALSA P083-C1 *CDH1* MLPA) e água estéril (Milli Q) e 32 µL deste mix adicionados em cada tudo de reação para seguir incubação a 54°C por 15 minutos e 98°C por 5 minutos. A etapa de **reação de PCR** (Figura 3.1 - C) inicia-se com adição de 10 µL de mix de PCR (SALSA *FAM PCR primer*, SALSA *Polymerase* - reagente comercial SALSA P083-C1 *CDH1* MLPA e água estéril) seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, e 1 ciclo de 72° C por 20 minutos.

Nesta técnica, para cada sequência-alvo existem duas sondas. Cada sonda está acoplada a um segmento de DNA de tamanho variável e sequências idênticas em 3' e 5' (*stuffer sequence*), esta se liga a um par de iniciador idêntico para todas as sondas. Após hibridação das sondas com a sequência-alvo, ocorre a ligação enzimática das mesmas por ação da enzima DNA ligase. A *stuffer sequence* não hibridiza com a sequência-alvo e isso permite diferentes tamanhos de fragmentos. Só ocorrerá amplificação mediante hibridização perfeita de ambas sondas às sequências-alvo seguido de ligação das mesmas (Figura 3.1). As sondas que foram eficientemente ligadas serão amplificadas e produzirão um sinal fluorescente.

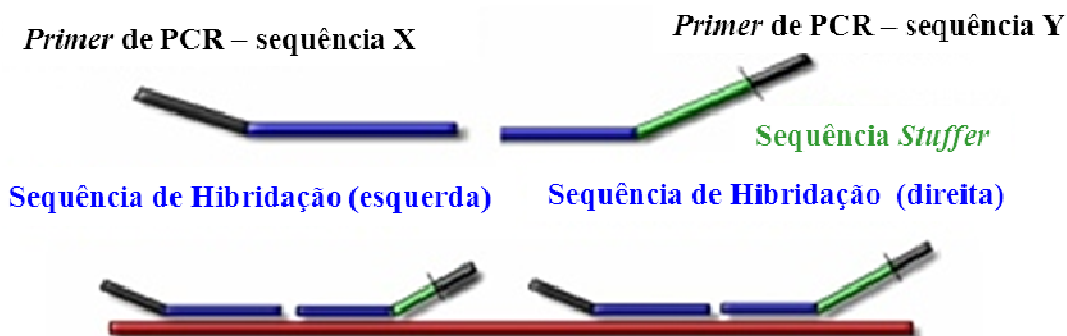
As reações de MLPA foram padronizadas em termocicladores Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™) e a separação de fragmentos por eletroforese capilar foi realizada em sequenciador ABI 3130xl (Applied Biosystems®) com uso de Liz 500 (Gene Scan™; Applied Biosystems®) e formamida HiDi (Applied Biosystems®) (Figura 3.1 – D). Os resultados de MLPA foram interpretados por leitura dos picos de fluorescência detectados por eletroforese capilar e comparados a um padrão de referência oriundo de banco de dados. A análise e interpretação de dados de MLPA foi realizada com o programa GeneMarker version 2.2.0 (SoftGenetics®) disponível em <http://www.softgenetics.com/GeneMarker.html>.

Tabela 3.3: Sondas MLPA para éxons do gene *CDH1*

Éxons <i>CDH1</i>	Sondas MLPA	Tamanho (bp)
1	CDH1 probe 12651-L19938	154
2	CDH1 probe 12654-L19369	193
3	CDH1 probe 02405-L19937	258
4	CDH1 probe 12656-L19936	364
5	CDH1 probe 02407-L01853	301
6	CDH1 probe 02408-L13240	329
7	CDH1 probe 02409-L19374	160
8	CDH1 probe 12653-L19725	148
9	CDH1 probe 16884-L19717	174
10	CDH1 probe 02411-L01857	202
11	CDH1 probe 02412-L01858	229
12	CDH1 probe 16885-L19718	382
13	CDH1 probe 02413-L19371	265
14	CDH1 probe 02414-L01860	283
15	CDH1 probe 02415-L19372	316
16	CDH1 probe 02416-L01862	337

O Kit SALSA P083-C1 para *CDH1* é composto também por sondas de controle interno desenhadas para as seguintes posições cromossômicas: 1q22, 2p22, 2q24, 3p25, 4p16, 4q25, 5q31, 6p12, 6q22, 9q21, 10p11, 10q26, 11q22, 12p13, 15q21, 19p23 e 21q21. Disponível em: <http://www.mrc-holland.com>.

A. Desnaturação e Hibridização



B. Ligação



C. PCR com primers universais X e Y

(amplificação exponencial apenas de sondas ligadas)



D. Análise de Fragmentos

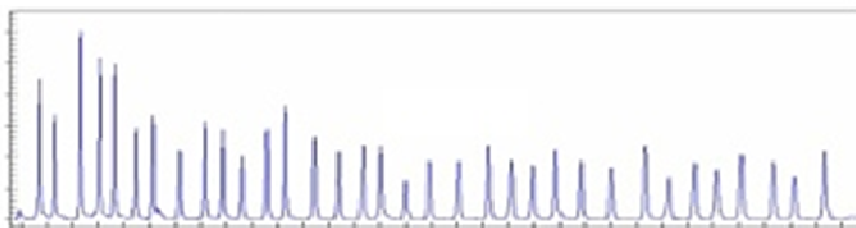


Figura 3.1: Etapas da técnica de *Multiplex Ligation Probe Amplification* (MLPA). Após a primeira etapa de desnaturação de DNA, as sondas de MLPA específicas são adicionadas a reação (A). As sondas são compostas de 3 partes distintas: região de hibridação (a que hibrida com a região de DNA de interesse), sequência “stuffer” (que possui tamanho variável dentre as sondas e por isso define o tamanho do fragmento e permite a separação eletroforética) e a região de ligação ao *primer* (igual em todas as sondas de um mesmo kit de MLPA). As sondas são descontínuas e, quando são perfeitamente hibridizadas a sequência alvo no DNA, são ligadas enzimaticamente por ação da enzima DNA ligase (B). As sondas ligadas serão amplificadas por PCR multiplex (C) e produzirão sinal fluorescente correspondente durante a análise de fragmentos (D).

3.7 ANÁLISE DE FRAGMENTOS

A metodologia de análise de fragmentos foi utilizada neste trabalho para avaliação de uma possível variante polimórfica no éxon 1 do gene *CDH1* em uma população hospitalar de 200 doadores sadios voluntários (grupo controle).

As reações de PCR foram otimizadas para um volume final de 50 μL , utilizando tampão de PCR *Colorless GoTaq® Flexi Buffer* (pH 8,5) (Promega®), 1,0 U de enzima *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega®); 10 pmol/ μL de oligonucleotídeos iniciadores; 0,2 mM de MgCl_2 ; 0,2 mM de dNTP; 20 ng/ μL de amostra de DNA e água deionizada estéril para completar o volume da reação. Para permitir a detecção dos alelos no sistema de genotipagem do seqüenciador automático capilar, foram utilizados os iniciadores CDH-1Fb e CDH-1Rb listados na Tabela 3.2 com a adição do fluorocromo 6-carboxi-fluoresceína (6-FAM) ao iniciador CDH-1Fb na região 5' (MWG Operon).

As ciclagens foram realizadas em termocicladores Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™) e incluiu-se, em todos os casos, controles negativos (sem DNA). O perfil térmico incluiu uma desnaturação inicial por 2 minutos a 95°C; 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 61°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; e 72°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram diluídos em água estéril (10 vezes em relação à concentração inicial) e avaliadas em um sequenciador automático de capilar ABI 3130xl (Applied Biosystems®) utilizando o marcador Liz 500 (Gene Scan™; Applied Biosystems®) e formamida HiDi (Applied Biosystems®). Os resultados foram analisados com uso do programa Peak Scanner™ Software v1.0 (disponível em <https://products.appliedbiosystems.com>).

As frequências gênicas e genóticas da variante polimórfica do éxon 1 foram calculadas pelo método de contagem direta. As frequências genóticas observadas foram comparadas com as esperadas segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, mediante testes de Chi-quadrado (χ^2).

3.8 ANÁLISE DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA E-CADERINA E PREDIÇÃO DAS ALTERAÇÕES NA ESTRUTURA PROTEICA ACARRETADA POR MUTAÇÕES PONTUAIS DO TIPO *MISSENSE*

No intuito de predizer o impacto das mutações do tipo *missense* na estrutura da proteína E-caderina, foi realizado um estudo da estrutura cristalográfica utilizando as informações de coordenadas cristalográficas disponíveis em programas específicos e banco de dados. Foram utilizados os bancos de dados UniProt (UniProtUK, disponível em www.uniprot.org) e RCS Protein Data Bank - PDB (disponível em <http://www.rcsb.org>). O programa de análise PyMol (disponível em <http://www.pymol.org>) foi usado para visualizar a estrutura tridimensional da E-caderina comparada à sequência contendo as variantes do tipo *missense*. Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com o Dr. Gabriel Limaverde Sousa, do Serviço de Pesquisa Clínica do INCA.

3.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA E-CADERINA

Cortes de 3 micras foram realizados a partir de tumores fixados e impregnados em parafina do diagnóstico (biopsia e/ou peça cirurgia) e montados sobre lâminas comerciais carregadas positivamente (Superfrost Plus®, Erviegas). Os cortes foram desparafinizados em xilol (Vetec®) e hidratados em soluções decrescentes de álcool etílico (Vetec®). As lâminas foram submetidas à recuperação antigênica em tampão de citrato de sódio 10mM, pH 6.0 utilizando panela de pressão.

A atividade endógena da peroxidase foi inibida com o reagente comercial *Hydrogen Peroxidase Block* (Thermo Scientific®) por 10 minutos. As lâminas passaram por 3 banhos (de 5 minutos cada) com tampão TBS (*Tris-buffered saline*, 0,3 mM Tris-Cl, 1,2 mM NaCl, pH 7.5) contendo 0,1% Tween20 (Sigma®). As proteínas foram bloqueadas com reagente comercial específico Ultra V Block (Thermo Scientific®) por 5 minutos.

Em seguida, as lâminas foram cobertas com o anticorpo primário anti-E-caderina humana (clone NCH-38, DakoCytomation) previamente diluído (1:200) em tampão TBS (*Tris-buffered saline*, 0,26 mM Tris-Cl, 1,07 mM NaCl, pH 7.5) contendo 0,1% de albumina sérica bovina (BSA, Merck®) e 0,2% de azida sódica (Sigma®) e

incubadas por 16 horas a 4°C. A detecção da reação foi realizada com o sistema comercial *HiDef DetectionTM HRP Polymer System* (Cell Marque®) de acordo com as especificações do fabricante, utilizando o substrato cromogênico *DAB Substrate Kit* (diaminobenzidina, Cell Marque®). Por fim, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, desidratados e acondicionados para a sua análise. Como controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por BSA 1% e submetido a todas as etapas descritas acima.

A imunomarcação foi analisada, considerando-se a localização (membranar ou citoplasmática) e a distribuição (focal ou difusa) da expressão da E-caderina nas células tumorais. A intensidade das marcações dos casos positivos foi classificada semiquantitativamente como fraca (+), moderada (++) e forte (+++). As áreas de mucosa gástrica normal foram utilizadas como controle positivo interno e a captação de imagens foi realizada com uso do aparelho *ScanScope CS* (Aperio Technologies®) Esta parte do trabalho foi realizada com o suporte da Área de Apoio à Pesquisa da Divisão de Patologia (DIPAT) do INCA e em colaboração da médica patologista Ivanir Martins de Oliveira.

4 RESULTADOS

4.1 Critérios de Câncer Gástrico Familiar e principais características clínicas

No nosso estudo, foram avaliados 14 pacientes (probandos) diagnosticados com CGD antes dos 45 anos de idade (n=11) ou com história familiar de CG (n=3) de acordo com os critérios clínicos expandidos de Brooks-Wilson (2004) (Tabela 4.1). Dos pacientes diagnosticados antes dos 45 anos, dois preenchem critérios adicionais: um membro da família diagnosticado com CG (Critério 1A, P1 = anexo 8.3) e um familiar diagnosticado com CLM (Critério 5, P9 = anexo 8.5). Nas famílias dos probandos P12 e P13 foram registrados dois casos de CG (Anexos 8.6 e 8.7, respectivamente) e na família do paciente P14, 3 casos de CG (Anexo 8.8), mas em nenhum familiar foi confirmado possível a presença de câncer gástrico tipo difuso.

Neste grupo de pacientes, a idade mediana foi de 40 anos (variação 24 – 73 anos), sendo 11 dos 14 pacientes (78,5%) acometidos antes dos 45 anos. Dez pacientes (71,4%) foram do sexo feminino e 4 (28,6%) do sexo masculino. (Tabela 4.1).

O sistema de estadiamento TNM – 7ª edição foi utilizado para caracterizar os tumores deste grupo de pacientes. Quatro pacientes (28,6%), no momento do diagnóstico apresentavam tumor maior que 5cm (pT3). Dez pacientes mostravam comprometimento de linfonodos (71,4%) e seis destes apresentavam estágio IV da doença (presença de metástase a distância).

O tratamento inicial foi cirúrgico em 11 pacientes, seguido de quimioterapia em três casos (8 casos de gastrectomia total e 3 de gastrectomia parcial). Dois pacientes receberam apenas tratamento quimioterápico (P4 e P12) e um tratamento paliativo (P13). Em nenhum dos casos, o intervalo de tempo entre o diagnóstico e o início do tratamento cirúrgico não ultrapassou os 3 meses. Apesar disso o intervalo de tempo entre o diagnóstico de CGD e o óbito foi menor que 18 meses em 8 dos 10 pacientes falecidos, com uma mediana de 7 meses (2-18 meses) (Tabela 4.2).

Tabela 4.1: Informações relacionadas ao histórico familiar de câncer dos pacientes com critérios clínicos de CGDH.

Paciente (sexo/idade)	Critério clínico para CGDH ¹	CG na família (idade)	Outros cânceres na família (idade)	Heredograma
P1 (M/29)	1A e 3	Tio (29)	Não	Anexo 8.3
P2 (F/29)	3	Não	Mãe com CR (28) e CCU (66); avô com CP (>65 anos); irmã com leucemia (45)	Anexo 8.4
P3 (M/24)	3	Não	Não	-
P4 (F/43)	3	Não	Não	-
P5 (F/42)	3	Não	Não	-
P6 (F/29)	3	Não	Não	-
P7 (F/32)	3	Não	Não	-
P8 (M/31)	3	Não	Não	-
P9 (F/38)	3 e 5	Não	Mãe com CLM (64); tia com CRim (64); avô com CCU (86)	Anexo 8.5
P10 (F/36)	3	Não	Não	-
P11 (F/21)	3	Não	Não	-
P12 (M/53)	2A	Mãe (62), irmã (46)	Irmã com CM (49)	Anexo 8.6
P13 (F/68)	2A	2 irmãos (46, 50)	Irmão com CPe (50); irmão com CPu (60); irmã com CC (60); filho com CF (50); filha com CEU (36)	Anexo 8.7
P14 (F/73)	2A	3 irmãos (33,55 e 57)	Tio com CPu (73)	Anexo 8.8

P: paciente/probando; CG: câncer gástrico; CR: câncer de reto; CCU: câncer de colo de útero; CLM: câncer lobular de mama; CRim: câncer de rim; CF: câncer de fígado; CPe: câncer de pele; CPu: câncer de pulmão; CP: câncer de próstata; CU: câncer de útero; CEU: câncer epidermóide uterino.

4.2 Características histopatológicas

O diagnóstico de CGD, em todos os casos, foi realizado a partir de biópsias gástricas obtidas durante exames endoscópicos (Figura 4.1 - A). Onze casos mostraram diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma gástrico pouco diferenciado com presença de células em anel de sinete (achado histopatológico mais comum nos casos de CGD) (Figura 4.1 - B; Tabela 4.3). A investigação de infecção por *H. pilory* foi realizada em apenas cinco pacientes, sendo dois casos positivos.

A expressão de E-caderina foi analisada por imuno-histoquímica em material fixado e impregnado em parafina correspondente ao diagnóstico de CGD (biópsia gástrica ou peça cirúrgica).

Em 12 dos 14 casos de CGD foi observada uma expressão da E-caderina com padrão membranar. De acordo com uma avaliação semi-quantitativa a intensidade da imunorreatividade foi forte (n=8) ou moderada (n=4), sendo que em 4 casos a expressão só foi detectada em $\leq 50\%$ das células tumorais (P5, P9 e P11 com expressão moderada e P12 com expressão forte). Em dois pacientes (P3 e P10) as células tumorais não apresentaram expressão da E-caderina (Figura 4.2; Tabela 4.3).

4.3 Achados moleculares

Nesse trabalho, foram identificadas em heterozigose duas variantes *missense* e duas variantes silenciosas na região codificante, e três variantes intrônicas no gene *CDH1* dos 14 pacientes estudados (Tabelas 4.4 e 4.5). Estes achados foram confirmados após sequenciamento direto de reações de PCR independentes.

4.3.1 Variantes polimórficas (SNPs)

As variantes silenciosas 933C>G (éxon 7) e 1896C>T (éxon 12), a variante *missense* 2253C>T (éxon 14) e as substituições identificadas nos íntrons 1 (48+6C>T) e 4 (531+10G>C) foram previamente descritas e se encontram

registradas no banco de dados do NCBI (dbSNP, www.ncbi.nlm.nih.gov/snp) (Tabela 4.4. Figura 4.3).

Uma deleção de 13 nucleotídeos no íntron 1, localizada a 63 nucleotídeos da junção com o éxon 1 (48+63-75del) foi identificada em 3 probandos não relacionados (P7, P10 e P13). Como esta variante não foi localizada em bancos de dados disponíveis (GeneCards, <http://www.genecards.org> e LOVD v.2.0 Build 34, <http://databases.lovd.nl/genomed/variants.php>) foi pesquisada também em amostras de DNA de sangue periférico de 200 doadores voluntários empregando a abordagem de análise de fragmentos fluorescentes. Para isto, durante este trabalho foi otimizada uma reação de PCR para a amplificação do éxon 1 (incluindo as junções íntron-éxon) utilizando um par de iniciadores com marcação fluorescente, permitindo a identificação simultânea de fragmentos de 360 pb e 347 pb, correspondente aos alelos selvagem (*wild-type* ou wt) e deletado, respectivamente (Figura 4.5).

Esta análise mostrou que a variante 48+63-75del trata-se de um polimorfismo na população utilizada como controle. O alelo deletado foi observado em 36 indivíduos analisados, sendo apenas um deles homocigoto para esta variante. As freqüências genotípicas e alélicas são descritas na Tabela 4.5. Esta variante se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada ($\chi^2=0,36$; grau de liberdade = 1; $p = 0,55$).

4.3.2 Mutação *missense* 1037A>C no éxon 8 do gene *CDH1*

Uma substituição A/C no nucleotídeo 1037 do éxon 8 foi detectada em heterozigose apenas no probando 2 (1037A>C). Esta substituição resulta na variação do aminoácido glutamina por prolina no *codon* 346 (p.Q346P), localizado na região de repetição EC-2 do domínio extracelular da proteína E-caderina.

Utilizando as informações de coordenadas cristalográficas da proteína E-caderina disponíveis nos banco de dados UniProt (ID P12830) e RCS Protein Data Bank/PDB (ID PDB 2O72) e o sistema de visualização molecular PyMol (<http://www.pymol.org>) foi possível a comparação da estrutura tridimensional da proteína normal e mutada (p.Q346P). O aminoácido prolina possui uma configuração estrutural em anel, e sabidamente é capaz de interromper estruturas secundárias

regulares, causando perturbações na molécula. De acordo com o modelo preditivo visualizado no sistema PyMol, uma substituição na posição 346 de glutamina por prolina na região EC-2 do domínio extracelular da E-caderina, poderia interromper a estrutura secundária dessa fita β , afetando a distribuição das pontes de hidrogênios e dos íons Ca^{2+} essenciais para a estabilização das interações homofílicas entre as E-caderinas (Figura 4.6).

A paciente P2 teve diagnóstico de adenocarcinoma gástrico pouco diferenciado com células em anel de sinete aos 29 anos. O exame histopatológico demonstrou uma forte expressão da proteína E-caderina em 85% das células tumorais (Tabela 4.3, Tabela 4.4 e Figura 4.4). Na família foram relatados casos de cânceres de reto, colo de útero, próstata e leucemia, porém não de câncer gástrico (Anexo 8.4). O tratamento desta paciente foi iniciado 2 meses após o diagnóstico com gastrectomia total seguida de quimioterapia com cisplatina e 5-fluorouracil (5-FU) e a sobrevida pós-tratamento foi pouco mais de 1 ano.

4.3.3 Análise de grandes de deleções por MLPA

Devido à baixa taxa de alterações germinativas identificadas pelo sequenciamento direto dos 16 éxons do gene *CDH1* nos 14 probandos estudados nesse trabalho, investigamos também a presença de grandes deleções e/ou inserções através da técnica de *MLPA* usando sondas comerciais, protocolos validados e rigorosos parâmetros de normalização. Em nenhum dos casos de CGD foi detectado este tipo de alterações (Figura 4.6). Os resultados gráficos e valores numéricos de normalização de dados de todos os pacientes estão mostrados no anexo 8.9.

Tabela 4.2: Tratamento e desfecho dos pacientes com critérios clínicos de CGDH.

Paciente (sexo/idade)	Tratamento inicial	Estadiamento ⁴	Tipo de cirurgia	Intervalo entre diagnóstico e tratamento (meses)	Óbito ⁵	Intervalo entre diagnóstico e óbito (meses)
P1 (M/29)	Cirurgia/Quimioterapia ¹	IV	GT	1	Sim	3
P2 (F/29)	Cirurgia/Quimioterapia ¹	IV	GT	2	Sim	18
P3 (M/24)	Cirurgia	pT3 pN1 pMx (IIB)	GT	2	Não	-
P4 (F/43)	Quimioterapia ¹	IV	-	5	Sim	18
P5 (F/42)	Cirurgia	pT2 pN3 pMx (IIIA)	GP	2	Não	-
P6 (F/29)	Cirurgia/Radioterapia	IV	GT	1	Sim	4
P7 (F/32)	Cirurgia	pT3 pN0 pMx (IIA)	GT	1	Não	-
P8 (M/31)	Cirurgia	pT3 pN0 pMx (IIA)	GP	3	Sim	33
P9 (F/38)	Cirurgia	pT3 pN3 pMx (IIIB)	GT	2	Sim	10
P10 (F/36)	Cirurgia	pT1a pN0 pMx (IA)	GT	1	Não	-
P11 (F/21)	Cirurgia	pT1 pN0 pMx (IA) pT4 pN0 pmX (IIB)	GP ²	2	Sim	108
P12 (M/53)	Quimioterapia ^{1,3}	IV	-	4	Sim	15
P13 (F/68)	-	IV	-	-	Sim	2
P14 (F/73)	Cirúrgico	pT4a pN1 pMx (IIIB)	GT	3	Sim	4

P: paciente/probando GT: gastrectomia total; GP: gastrectomia parcial. ¹Cisplatina e 5-fluorouracil (5-FU); ² Paciente recaiu 8 anos mais tarde, fez cirurgia de segmento gástrico proximal (côto gástrico), segmento jejunal e baço e tratou com quimioterapia (Fluorouracil) e radioterapia; ³Paciente não encaminhado a cirurgia pois apresentava metástases em coluna vertebral. ⁴Estadiamento TNM – 7ª edição. ⁵Última atualização em Janeiro/2013.

Tabela 4.3: Características histopatológicas dos pacientes com critérios clínicos de CGDH.

Paciente (sexo/idade)	Diagnóstico de CG			Imunohistoquímica para E-caderina ²		
	Material analisado	DH	<i>H. pilory</i> ¹	Material analisado	Imunoreatividade	Intensidade
P1 (M/29)	Biopsia gástrica (corpo)	ACAS	ND	Linfonodo para-aórtico ⁴	Positiva (95%)	Forte
P2 (F/29)	Biopsia gástrica	ACAS	ND	Implante pélvico ⁴	Positiva (85%)	Forte
P3 (M/24)	Biópsia de junção esôfago-gástrica	ACAS	ND	Peça cirúrgica ⁴	Ausente	-
P4 (F/43)	Biopsia gástrica (pré-piloro)	AMS ³	Não	Biopsia gástrica (piloro)	Positiva (90%)	Forte
P5 (F/42)	Biopsia gástrica (canal pilórico)	ACAS	Sim	Biopsia gástrica (canal pilórico)	Positiva (30%)	Moderada
P6 (F/29)	Biopsia gástrica	ACAS	ND	Biopsia gástrica	Positiva (70%)	Forte
P7 (F/32)	Biopsia gástrica (corpo)	ACAS	Não	Biopsia gástrica (corpo)	Positiva (60%)	Moderada
P8 (M/31)	Biopsia gástrica	ACAS	ND	Biopsia gástrica	Positiva (80%)	Forte
P9 (F/38)	Biopsia gástrica (incisura angular)	ACAS	ND	Biopsia gástrica (incisura angular)	Positiva (40%)	Moderada
P10 (F/36)	Biopsia gástrica (antro)	ACAS	Sim	Peça cirúrgica ⁴	Ausente	-
P11 (F/21)	Biopsia gástrica (incisura angular)	ACAS	ND	Biopsia gástrica (incisura angular)	Positiva (50%)	Moderada
P12 (M/53)	Biopsia gástrica	ACAS	ND	Biopsia gástrica	Positiva (40%)	Forte
P13 (F/68)	Biopsia gástrica	ACPD	ND	Biopsia gástrica	Positiva (70%)	Forte
P14 (F/73)	Biopsia gástrica	ACMD	Não	Biopsia gástrica	Positiva (90%)	Forte

P: paciente/probando; CG: câncer gástrico; DH: diagnóstico histopatológico; ACPD: adenocarcinoma pouco diferenciado; ACAS: adenocarcinoma pouco diferenciado com células em anel de sinete; ACMD: adenocarcinoma moderadamente diferenciado; AMS: adenocarcinoma pouco diferenciado com células muco secretora; ND: não determinado; GT: gastrectomia total; GP: gastrectomia parcial. ¹A infecção pelo *H. pilory* foi determinada pela técnica especial de Wason (DIPAT/INCA). ²O padrão de todas as imunomarcações foi membranar. Os valores entre parênteses indicam porcentual de células tumorais positivas para a E-caderina. A intensidade das marcações dos casos positivos foi classificada como fraca (+), moderada (++) e forte (+++). ³Paciente com diagnóstico concomitante de carcinoma epidermóide pouco diferenciado em terço médio esofágico. ⁴Biópsia gástrica não disponível no arquivo da DIPAT/INCA (revisão de lâminas, devolução de blocos, etc.).

Tabela 4.4: Alterações germinativas encontradas no gene *CDH1* dos pacientes com critérios clínicos de CGDH.

Variante ¹	Tipo	Registro no dbSNP ²	Região	Sequência	Frequência ³	Probandos	Pop Estudada (nº total) ⁵	Freq. Pop ⁶
1037A>C (p.Q346P)	Substituição <i>missense</i>	-	Éxon 8	cctggtggttc(A/C)agctgctgacc	1/32 (0.03)	P2	-	-
48+63-75del	Deleção	-	Íntron 1	ccccagccc(<u>cgtgccccagccc</u> -)tgcgccctg	6/32 (0.19)	P7 ⁴ , P10 e P13 ⁴	-	-
48+6T>C	SNP	rs3743674	Íntron 1	ctgcaggtagct(T/C)cggatcccctg	5/32 (0.16)	P4, P6, P7, P10 e P13	LA, NA, OA (1984)	0.25
531+10G>C	SNP	rs33963999	Íntron 4	aggtagagaaa(G/C)aagttctctgt	1/32 (0.03)	P8	NA, EU, MN (1915)	0.04
933C>G (p.L311L)	SNP	rs35539711	Éxon 7	gatcctgagct(C/G)cctgacaaaa	2/32 (0.06)	P4 e P9	NA, OA, EU, MN (6919)	0.01
1896C>T (p.H632H)	SNP	rs33969373	Éxon 12	gaactaacaca(C/T)ggggcgcgagtg	1/32 (0.03)	P13	NA, AO, EU, MN (7151)	0.03
2253C>T (p.N751K)	SNP	rs33964119	Éxon 14	accgggacaa(C/T)gtttattacta	1/32 (0.03)	P13	NA, MN (738)	0.01

¹ Nomenclatura usada: Den Dunnen e Antonarakis, 2012; ² www.ncbi.nlm.nih.gov/snp; ³ Frequência (nosso grupo) = número de vezes que uma variante foi observada/número de cromossomos examinados. ⁴ Probandos com 48+63-75del em homocigose. ⁵ População previamente estudada de acordo com www.genecards.org, () = número total de amostras analisadas. LA: Leste da Ásia; NA: Norte da América; OA: Oeste da África; EU: Europa; MN: Multi nacional. ⁶ Frequência nos grupos previamente estudados (www.genecards.org).

Tabela 4.5: Frequências genótípicas e alélicas da variante intrônica 48+63-75del na população de doadores voluntários.

Genótipos ¹	N (%)	Alelos	Frequência
Homocigoto - wt/wt	164 (82,0)	wt	0,91
Heterocigoto - wt/del	35 (17,5)	del	0,09
Homocigoto - del/del	1 (0,5)		
Total	200 (100)		

wt = alelo sem deleção intrônica; del = alelo com deleção de 13 nucleotídeos (48+63-75del).

¹ Em equilíbrio de Hardy-Weinberg

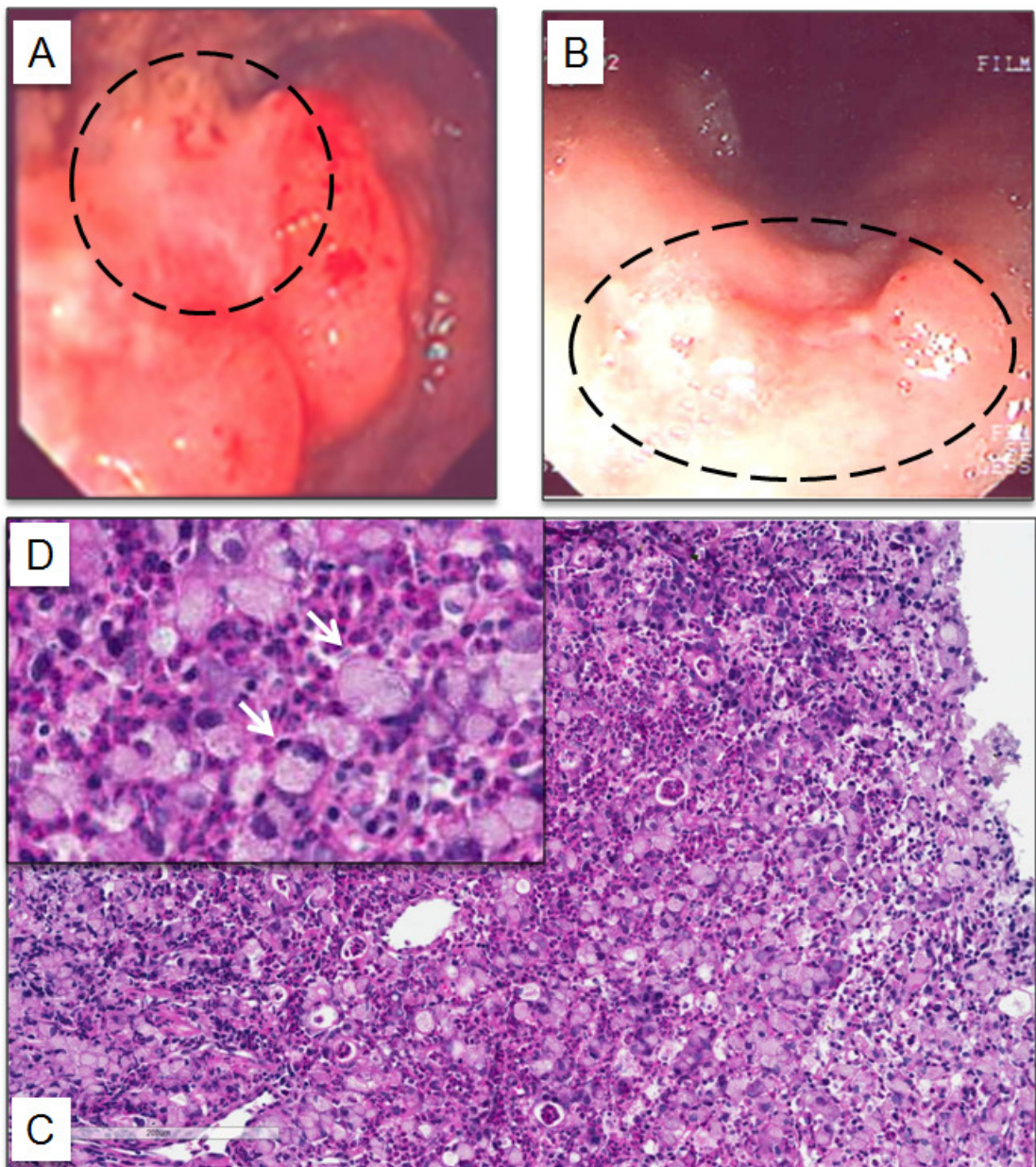


Figura 4.1: Achados endoscópicos e histopatológicos representativos.

A: Imagem obtida por endoscopia digestiva alta (EDA) mostrando tumor gástrico pouco diferenciado (Adenocarcinoma pouco diferenciado com células em anel de sinete, ACAS), destacando área ulcerada (Paciente P1); B: Aspecto endoscópico de ACAS em estágio precoce, mostrando lesão elevada com depressão central (Paciente P); C: Corte histológicos de ACAS corado com Hematoxilina e Eosina em médio aumento; D: Aspecto característico das células em anel de sinete (setas) em maior aumento (Paciente P5). As imagens endoscópicas e as microfotografias foram cedidas pela médica endoscopista Maria Aparecida Ferreira (Serv. de Endoscopia Digestiva/INCA) e pela médica patologista Ivanir Martins de Oliveira (DIPAT/INCA), respectivamente.

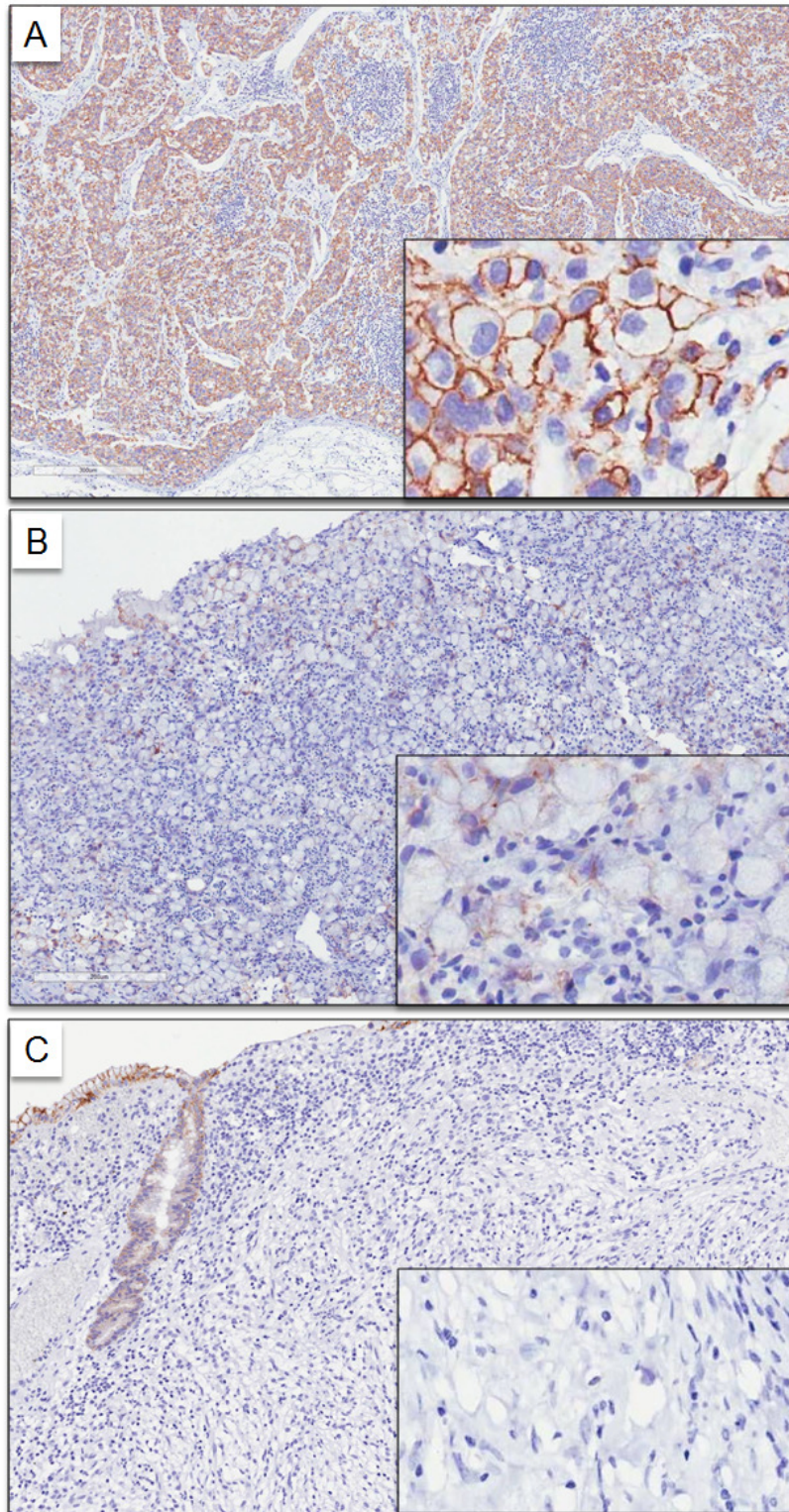


Figura 4.2: Avaliação da expressão de E-caderina em CGD.

Microfotografias de CGD exibindo diferentes padrões de expressão e intensidade da imunoreatividade ao anticorpo anti-E-caderina humana, clone NCH-38. A: Imagem de adenocarcinoma com CAS metastático (linfonodo para-aortico) mostrando positividade forte em 95% das células tumorais, em médio e maior aumento (destaque) (Paciente P1); B: Imagem de biopsia gástrica (canal pilórico) com adenocarcinoma pouco diferenciado com CAS, mostrando positividade moderada em 30% das células tumorais (focal), em médio e maior aumento (destaque) (Paciente P5); C: Imagem em médio aumento de peça cirúrgica (gastrectomia total) com adenocarcinoma pouco diferenciado tipo difuso sem expressão de E-caderina, porém com expressão em epitélio normal, em médio e maior aumento (destaque) (Paciente P3).

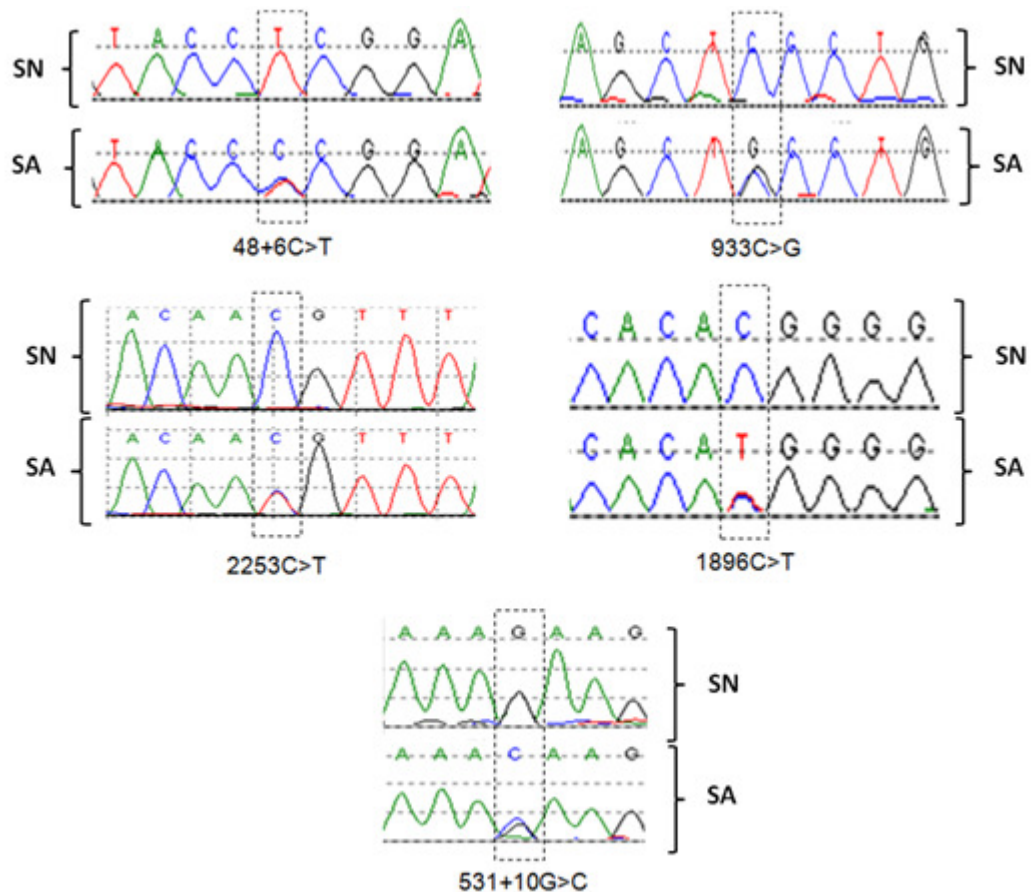


Figura 4.3: Variantes polimórficas SNPs identificadas no grupo de pacientes estudados. As variantes silenciosas 933C>G (éxon 7) e 1896C>T (éxon 12), a variante missense 2253C>T (éxon 14) e as substituições identificadas nos íntrons 1 (48+6C>T) e 4 (531+10G>C) foram previamente descritas. Nomenclatura usada: Den Dunnen e Antonarakis, 2012. SN: sequência normal; SA: sequência alterada.

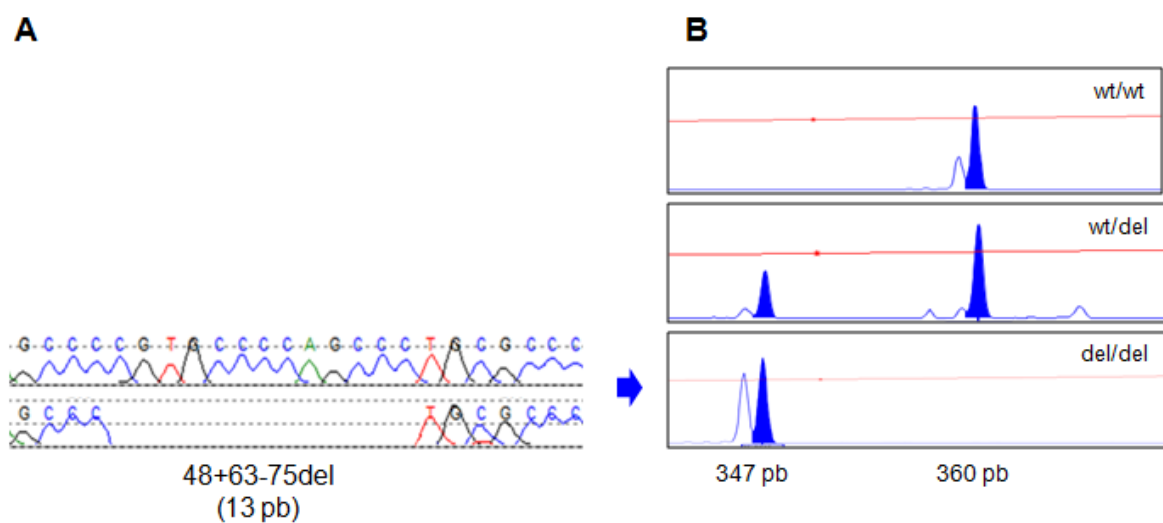


Figura 4.4: Identificação de deleção intrônica polimórfica 48+63-75del. A deleção 48+63-75del foi identificada por sequenciamento direto (A) e análise de fragmentos fluorescentes (B) em 3 probandos (P7, P10 e P13) e em 35/200 doadores voluntários.

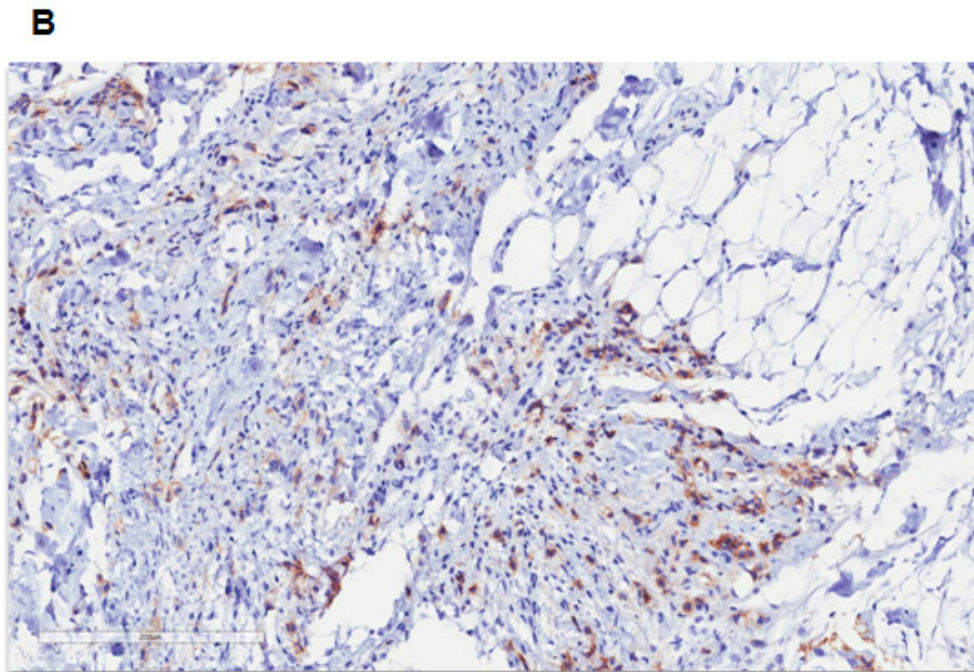
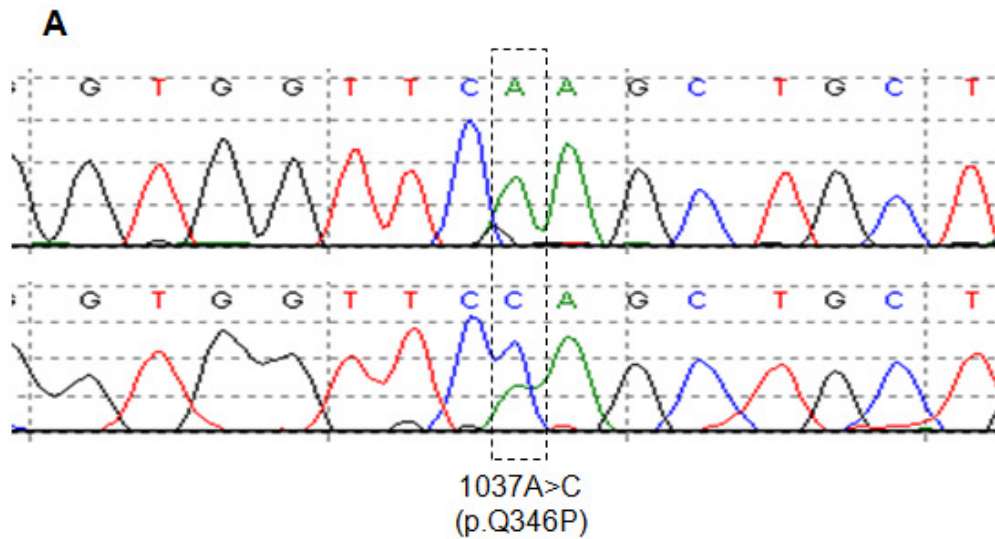


Figura 4.5: Mutação *missense* 1037A>C identificada em paciente com ACAS.

Achados moleculares e hispatológicos no probanco P2. A: Esferograma mostrando a substituição *missense* 1037A>C germinativa em heterozigose identificada apenas nesse paciente; B: Microfotografia em médio aumento de adenocarcinoma com CAS (implante pélvico) mostrando positividade forte para E-caderina em 85% das células tumorais.

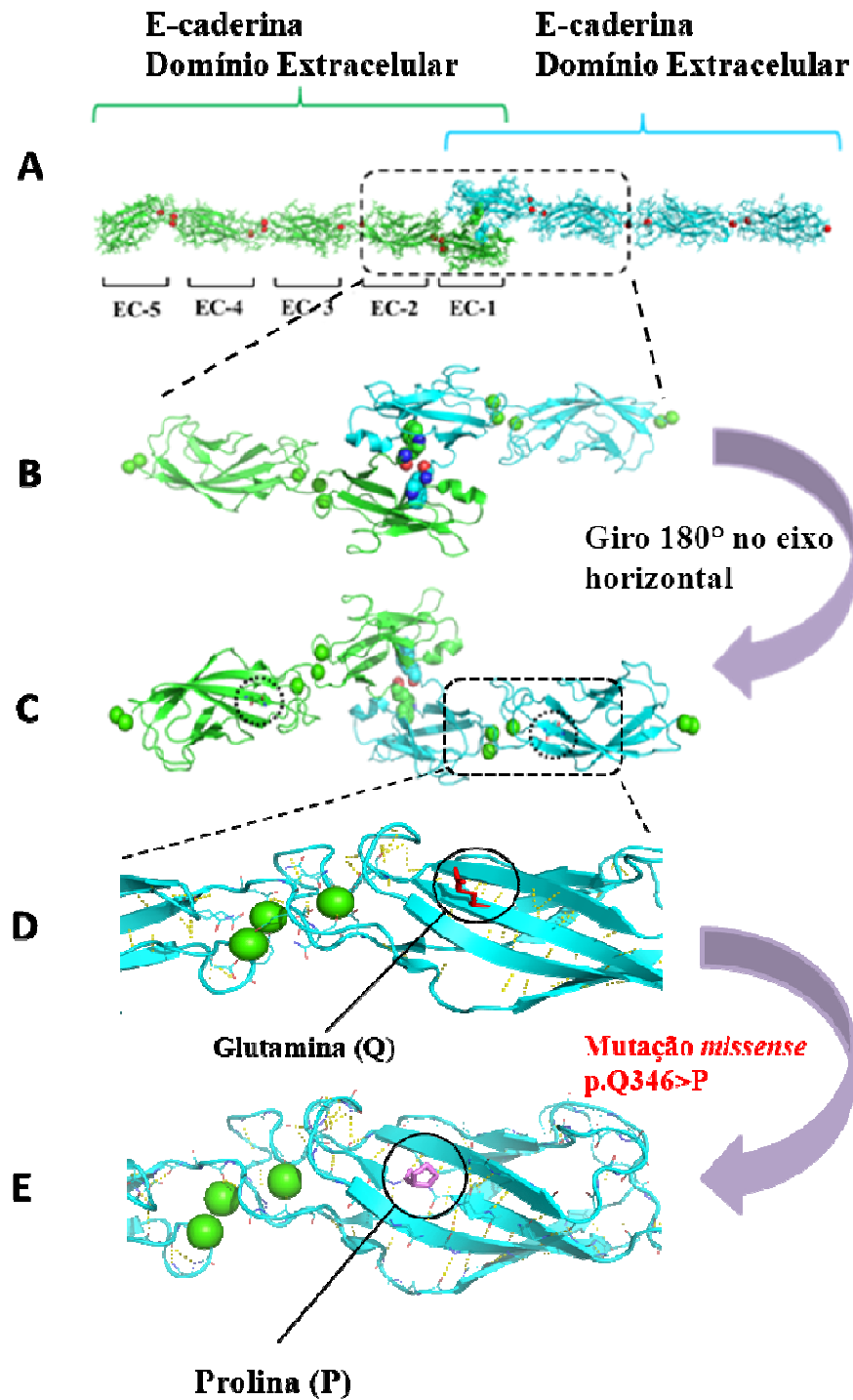


Figura 4.6: Análise da estrutura cristalográfica da E-caderina e predição das alterações na estrutura proteica acarretada pela mutação *missense* p.Q346P. A: Interação homofílica extracelular de duas E-caderinas; EC-1 – EC-2: regiões de repetição (*tandem*); B: ampliação da interação extracelular e das regiões EC-1 e EC-2; C: visualização do aminoácido glutamina na posição 346; D: destaque para o aminoácido glutamina (em vermelho) associado à estrutura secundária de fita β . Linhas amarelas entre as fitas β representam ligações de pontes de hidrogênio; E: Modelo preditivo da substituição da glutamina por um aminoácido prolina (com configuração estrutural em anel, em rosa) originada pela mutação *missense* 1037A>C identificada no P2. De acordo com este modelo esta mudança pode gerar um distúrbio na estrutura da fita β .

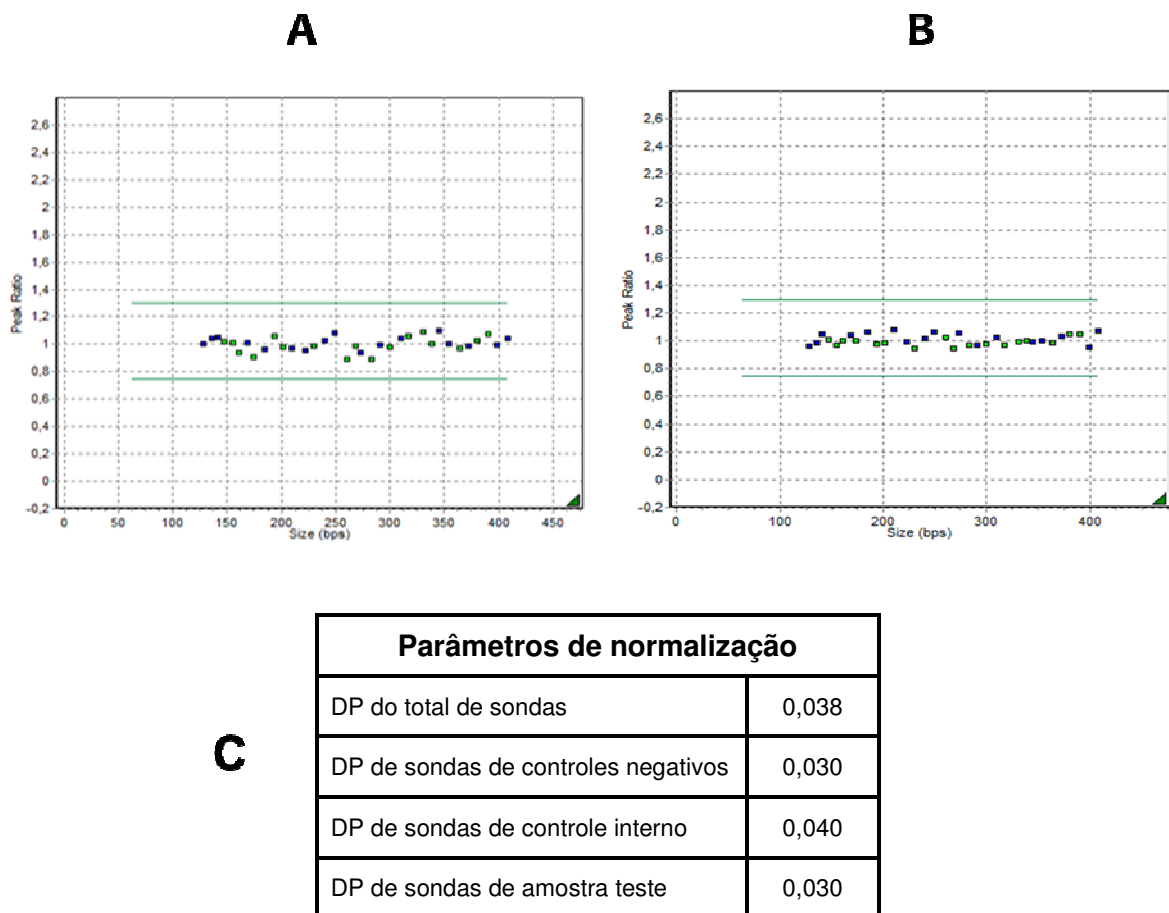


Figura 4.7: Análise de grandes deleções e inserções por *MLPA*.

A e B: Representação gráfica dos resultados da amplificação das sondas específicas para os 16 éxons do gene *CDH1* e regiões de controle interno. A: Amostra de DNA de sangue periférico de doador voluntário; B: amostra de DNA de sangue periférico de paciente P1 (resultado negativo para presença de deleções e/ou inserções); C: Principais parâmetros numéricos de normalização de dados (valores $< 0,1$ são aceitos como confiáveis para uma análise adequada). Gráficamente, a normalização de dados é observada com todos os pontos de amostras dentro faixa normal (faixa verde mostrada na imagem A e B) onde a relação de picos normais varia apenas de 0,7 – 1,3. Uma deleção é identificada quando um ponto referente a uma sonda específica de um dos éxons do gene *CDH1* estiver abaixo da faixa normal ($< 0,7$) e os valores tabelados forem confiáveis. Uma inserção poderá ser identificada quando um ponto referente a uma sonda específica de um dos éxons do gene *CDH1* estiver acima da faixa normal ($> 1,3$) e os valores tabelados forem aceitáveis. DP: Desvio.

5 DISCUSSÃO

A maioria dos carcinomas gástricos são formas esporádicas, mas em 10% dos casos existe agregação familiar e destes, apenas, 1% a 3% são carcinomas hereditários (OLIVEIRA; SERUCA e CARNEIRO, 2009; BLAIR *et al.*, 2012).

No contexto da agregação familiar, um determinado tipo de câncer é mais frequente que o esperado dentro de uma família, sugerindo uma maior susceptibilidade de seus membros a fatores ambientais. Nos casos de CG com agregação familiar os parentes em primeiro grau do portador do CG apresentam um risco médio de desenvolverem a doença duas a três vezes superior à população em geral (BEVAN e HOUSTON, 1999). Este risco é 1,4 vezes superior para o CG do tipo intestinal e 7 vezes maior para o tipo difuso (PALLI, 1994).

O câncer hereditário se caracteriza pela existência de um defeito genético responsável pelo aparecimento da doença com um determinado padrão de transmissão de geração em geração. O CG hereditário foi descrito pela primeira vez em 1964 em três famílias Maori da Nova Zelândia, nas quais foram diagnosticados múltiplos casos de CGD em indivíduos jovens (JONES, 1964). Em 1998 GUILFORD e col. descreveram por primeira vez mutações no gene *CDH1* em membros destas famílias Maori (GUILFORD *et al.*, 1998).

Em 1999 o *Internacional Gastric Cancer Linkage Consortium* (IGCLC) estabeleceu critérios para definir as várias síndromes de CG familiar e definiu o carcinoma gástrico difuso hereditário (CGDH) como uma entidade própria (CALDAS *et al.*, 1999), que permanece até a presente data como a única síndrome hereditária associada ao CG.

O CGDH apresenta um padrão de hereditariedade autossômica dominante associando a mutações germinativas do gene *CDH1* em cerca de 30% das famílias com critérios de inclusão (PEDRAZZANI *et al.*, 2007; KAURAH *et al.*, 2007; OLIVEIRA; SERUCA e CARNEIRO, 2009; GUILFORD; HUMAR e BLAIR, 2010). No entanto, as causas genéticas para a maioria dos casos de CGDH são ainda desconhecidas.

Os critérios do IGCLC são fundamentalmente epidemiológicos, o que implica algumas limitações. Por serem muito restritivos podem dificultar a inclusão de famílias pequenas e podem não contemplar a inclusão de portadores de novas mutações ou de famílias inadequadamente estudadas. Desta forma, as alterações germinativas no gene *CDH1* foram analisadas também em pacientes com CG com

critérios modificados menos restritivos: a) CGD familiar - CGDF (famílias com agregação de CG e casos de CGD, porém sem todos os critérios do IGCLC para CGDH); b) CG familiar - CGF (famílias com agregação de CG, mas sem informações disponíveis do subtipo histológico) e c) CGD em adultos jovens ou *early-onset diffuse gastric cancer* - EODGC (Pacientes com CGD isolado sem história familiar, diagnosticados antes dos 45 anos de idade) (CALDAS *et al.*, 1999).

No que se refere à definição de CGDH, que para o IGCLC se baseia, exclusivamente em critérios clínicos, o *New Zealand HDGC Group* restringe-os apenas aos casos em que foram identificadas mutações no gene *CDH1*. Os casos sem alterações germinativas no *CDH1*, apesar de cumprirem os critérios do IGCLC, são para este grupo, classificados como CGDF (BLAIR *et al.*, 2006).

Embora inicialmente não tenha sido descrita nenhuma associação entre casos definidos como CGDF e alterações no gene da E-caderina, estudos mais recentes descreveram alterações germinativas em cerca de 10% destas famílias em cerca de 7% de pacientes com EODGC (PEDRAZZANI *et al.*, 2007; OLIVEIRA; SERUCA e CARNEIRO, 2009) indicando a necessidade de ampliar os critérios clínicos para indicar o teste genético para mutações e/ou deleções germinativas no gene *CDH1* (FITZGERALD *et al.*, 2010).

O presente é o primeiro estudo no Brasil, de centro único, a investigar as alterações germinativas no gene *CDH1* em pacientes com critérios clínicos de CGDH. Foram analisados 14 pacientes matriculados e atendidos no Instituto Nacional de Câncer (INCA) preenchendo algum dos seguintes critérios: a) dois ou mais casos de CG, com pelo menos um caso de diagnóstico de CGD antes dos 50 anos; b) três ou mais casos de CG, independente da idade, com pelo menos um caso com diagnóstico de CGD; c) casos isolados, com diagnóstico de CGD antes dos 45 anos; d) casos isolados, com diagnóstico de CGD e câncer lobular de mama (CLM); e) um membro da família diagnosticado com CGD e outro com CLM e f) um membro da família diagnosticado com CGD e outro com câncer de cólon emanel de sinete (BOOKS-WILSON *et al.*, 2004).

Para fins deste estudo foram analisados 11 pacientes com CGD diagnosticados antes dos 45 anos de idade sem antecedentes de CG na família (EOGC) e 3 pacientes com CGD acima de 50 anos de idade com CG familiar. Após amplificação por PCR e sequenciamento direto dos 16 éxons do gene *CDH1* (incluindo as junções éxon-íntron), identificamos uma substituição de tipo *missense*

no éxon 8 do gene *CDH1* (1037A>C) em apenas um dos 11 pacientes com EODGC, que desenvolveu um adenocarcinoma pouco diferenciado com células em anel de sinete aos 29 anos. Esta frequência (9,1%) é similar aos dados previamente publicados em pacientes canadenses (11,1%), italianos (9,5%) ou coreanos (8,0%) com EODGC (BACANI *et al.*, 2006; CORSO *et al.*, 2011; JAKUBOWSKA *et al.*, 2010).

Durante este trabalho, foram identificadas também 5 variantes polimórficas de tipo SNP (*Single-Nucleotide Polymorphism*) previamente descritas em pacientes com CGD e CGDH (BERX *et al.*, 1998; GUILFORD *et al.*, 1998; YABUTA *et al.*, 2002; JAKUBOWSKA *et al.*, 2010). Descrevemos também, pela primeira vez, uma deleção intrônica germinativa de 13 pb identificada em 3/14 probandos não relacionados assim como em 36/200 doadores voluntários (população controle).

O espectro das mutações germinativas no *CDH1* é heterogêneo e inclui substituições (pontuais), pequenas deleções, inserções e inserções/deleções (SURIANO G *et al.*, 2003; SURIANO G *et al.*, 2005; SURIANO G *et al.*, 2006; SCHRADER *et al.*, 2008). Recentemente, grandes deleções germinativas abrangendo um ou dois éxons do gene *CDH1* foram descritas em famílias, canadenses, européias e japonesas com critérios clínicos para CGDH (OLIVEIRA *et al.*, 2009b; YAMADA *et al.*, 2011). Contudo, no presente trabalho, não foi identificado este tipo de alterações germinativas no *CDH1* em nenhum dos pacientes com CGD analisados de acordo com a técnica de MLPA.

Contrariamente a outras síndromes de predisposição familiar ao câncer, apenas a metade das mutações do gene da E-caderina, conhecidas como tipo *frameshit* e *nonsense*, acarretam em uma completa perda da função protéica. As restantes mutações são do tipo *splice-site* e *missense*, que correspondem a aproximadamente 20 e 30% do total de mutações germinativas identificadas, respectivamente (CORSO *et al.*, 2012). O papel patogênico das mutações do tipo *missense* não foi completamente determinado e representa um desafio no manejo clínico das famílias com CGDH, devido principalmente à impossibilidade de ponderar as consequências funcionais deste tipo de mutações. A mutação *missense* 1037A>C (p.Q346P) identificada no probando P2 resulta na substituição de um aminoácido glutamina por uma prolina na posição 346, especificamente em uma das fitas β , na região de repetição EC-2 do domínio extracelular da proteína E-caderina. De

acordo com um modelo de simulação tridimensional utilizando o sistema de visualização PyMol comparamos a estrutura cristalográfica das proteínas E-caderina normal e mutada (p.Q346P) para avaliar o efeito que a inserção de uma prolina acarreta na estrutura secundária da fita β . Como foi apresentado na seção anterior (Resultados), esta análise preliminar evidenciou que, pelas características estruturais da prolina, a substituição poderia potencialmente induzir câmbios drásticos na estrutura conformacional da fita β e afetar o padrão de distribuição das pontes de hidrogênios e levar a distúrbios nas interações homofílicas entre moléculas de E-caderinas. Embora esta seja uma conjetura atraente, precisamos confirmar esta hipótese com simulações computacionais mais complexas, empregando sistemas e equipamentos apropriados que incorporem à modelagem molecular *in silico* as variáveis e ajustes necessários ao modelo em questão. Por outro lado, é mandatório nesses casos conduzir ensaios funcionais de agregação e invasão celular *in vitro* para determinar o impacto dessas mutações na função da E-caderina e o seu papel na patogênese do CGDH (SURIANO G *et al.*, 2003; SURIANO G *et al.*, 2006). Nesses casos postula-se que uma atividade reduzida da E-caderina *in vitro* também pode constituir um evento inicial suficiente para o desenvolvimento da doença.

Os nossos resultados suportam a noção que as alterações germinativas na E-caderina são responsáveis apenas por uma pequena fração de casos CG em pacientes jovens (<45 anos) com ou sem historia familiar de CG.

O EOGC pode ocorrer em formas esporádicas ou hereditárias. Histórico familiar de GC tem sido relatada em cerca de 10% de pacientes com EOGC de tipo difuso e, por conseguinte, estes pacientes são frequentemente considerados fortes candidatos a ser parte de famílias com CGDH. As mutações germinativas inativadoras e deleções no gene *CDH1* são um fator genético bem documentado associado com EODGC assim como com o CGDH. No entanto, mutações germinativas do gene *CDH1* foram também documentadas em pacientes com EODGC com e sem critérios para CGDH (GUILFORD *et al.*, 1998; SURIANO *et al.*, 2003; OLIVEIRA; SERUCA e CARNEIRO, 2009; CARNEIRO *et al.*, 2010). Considerando os casos aparentemente esporádicos, cerca de 6% dos casos com EODGC podem estar associados a variantes potencialmente deletérias do gene da E-caderina (PEDRAZZANI *et al.*, 2007).

A maior série de pacientes com EODGC com informação de mutações germinativas no gene *CDH1* foi relatada por BACANI e col. (2006), onde foram identificadas oito mutações em 81 pacientes oriundos de Canadá (11,1%) com menos de 50 anos de idade (BACANI *et al.*, 2006). OLIVEIRA e col. (2004), também descreveram uma grande série de 54 pacientes com EOGC do tipo difuso ou misto com cinco mutações germinativas no gene *CDH1* (9,3%) (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Uma recente revisão sistemática dos dados publicados sugere que as mutações germinativas no gene *CDH1* ocorrem em cerca de 7,0 % dos pacientes com EOGC com subtipo histológico difuso ou misto. Destas, somente 2,0% das mutações comprovadamente patogênicas em ensaios *in vitro* foram atribuídas a casos diagnosticados antes dos 35 anos de idade (CORSO *et al.*, 2012). Considerando que as alterações germinativas no *CDH1* parecem ser os únicos defeitos genéticos descritos para o grupo de pacientes com EOGC com subtipo histológico difuso ou misto, o teste molecular para *CDH1* parece ser pertinente e também deve ser indicado para os pacientes jovens (<45 anos) com diagnóstico de CGD com ou sem historia familiar de CG (CORSO *et al.*, 2012).

A diminuição da expressão da E-caderina é frequentemente encontrada em várias neoplasias epiteliais durante a progressão do tumor e se correlaciona com uma maior capacidade de infiltração e poder metastático dos tumores devido à perda de adesão celular e aumento da mobilidade celular (CARNEIRO *et al.*, 2012). Tipicamente, alterações no gene *CDH1* podem ser responsáveis pela falta de expressão protéica em uma fração de CG difusa tanto esporádico como hereditário (BECKER, 1994; GUILFORD *et al.*, 1998; MACHADO *et al.*, 2001; OLIVEIRA; SERUCA e CARNEIRO, 2009).

No nosso estudo a expressão variável de E-caderina, analisada por imunohistoquímica em material tumoral correspondente ao diagnóstico de CGD, não esteve correlacionada com nenhum dos parâmetros clínicos e/ou morfológicos dos pacientes analisados. A expressão de E-caderina foi confirmada em 10 dos 14 casos, sendo que em 4 casos menos de 50% das células tumorais apresentaram expressão forte ou moderada. Em dois pacientes com EOGC as células tumorais não apresentaram expressão da E-caderina. Dentre o grupo de casos com expressão forte foi identificado o caso com mutação missense no éxon 8 do gene

CDH1 (1037A>C). Estes resultados devem ser interpretados necessariamente no contexto de achados complementares.

MODELOS ALTERNATIVOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE CG FAMILIAR

Em alguns casos de agregação familiar de CG a conjugação de uma suscetibilidade genética individual com uma exposição a fatores ambientais, poderia contribuir para um número aumentado de indivíduos afetados na mesma família. Um bom exemplo de susceptibilidade para o CG é o “gene-cluster” da Interleucina-1, descrito numa série de CG esporádicos (MACHADO *et al.*, 2001). Quanto à possível influência de fatores ambientais, alguns estudos concluíram que a ocorrência de câncer de estômago em algumas famílias poderia ser devido à agregação familiar da infecção por *H. pylori* (ASCANO *et al.*, 2001), já que este microorganismo pode reduzir a expressão da E-caderina através de mecanismos de metilação (CHAN, 2006).

Aproximadamente dois terços dos casos com critérios clínicos de CGDH não estão associados a uma causa genética específica. Para os portadores de CGDH com gene *CDH1* mutado, a única alternativa para a prevenção de CG invasivo é a gastrectomia total profilática (PEDRAZZANI *et al.*, 2007; GUILFORD *et al.*, 1998; NORTON *et al.*, 2007). Já para indivíduos em que a causa genética de CGDH é desconhecida é recomendado um protocolo de vigilância endoscópica com biópsias aleatórias para detecção de alterações pré-malignas precursoras de CGD (células em anel de sinete) (STEFANOFF e FERREIRA, 2009). Como a sensibilidade do método de rastreio é baixa é difícil identificar, de forma precoce, os indivíduos deste grupo de risco. Por este motivo, o conhecimento de um fator de predisposição genética ao CG é crucial para o manejo das famílias com CGDH (OLIVEIRA *et al.*, 2004; TIAN *et al.*, 2011; VOGELAAR *et al.*, 2012;).

A E-caderina interage com uma variedade de proteínas celulares, como α - e β -catenina, mediando a sinalização e modulando a organização do citoesqueleto. A inativação de uma catenina resulta no rompimento do complexo citoplasmático caderina-catenina e gera incapacidade da E-caderina em estabelecer a adesão celular mesmo quando seu domínio extracelular permanece intacto (VAN AKEN *et al.*, 2011; CARNEIRO *et al.*, 2012). Vem sendo descrito na literatura que alterações em outros genes do complexo caderina-catenina possam representar uma causa

genética para o desenvolvimento do CGDH (LYNCH, 2005; YAMADA *et al*, 2007; BERX e ROY, 2009; TIAN *et al.*, 2011; MAJEWSKI *et al.*, 2012; VOGELAAR *et al*, 2012). Identificaram uma mutação germinativa truncada no gene da α -catenina (*CTNNA1*) em famílias portadoras de CGDH (MAJEWSKI, 2012). Vogelaar e col descrevem que o gene da β -catenina (*CTNNB1*) pode ser considerado um candidato a predisposição ao CGD (LYNCH *et al*, 2005; VOGELAAR *et al.*, 2012). Outros trabalhos apontam genes como *JUP* e *TP53* com possível associação ao CGDH (OLIVEIRA *et al*, 2004; YAMADA *et al*, 2007; SCHUETZ *et al.*, 2012), entretanto os resultados são inconclusivos.

Por outro lado, os carcinomas gástricos podem ser encontrados em outras síndromes de predisposição genética ao câncer tais como síndrome de Lynch, polipose adenomatosa familiar, síndrome de Peutz-Jeghens, síndrome de Cowden e síndrome de Li- Fraumeni.

A síndrome de Lynch é uma doença hereditária autossômica dominante associada a mutações germinativas em genes de reparação do DNA (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *etc.*) (ROSA *et al*, 2008). As famílias a serem diagnosticadas são selecionadas com base em critérios clínicos, nomeados de Critérios de Amsterdã descritos em 1991 e revistos em 1999 ou critérios menos restritos como os de Bethesda. A síndrome de Lynch confere um risco elevado de carcinoma do cólon e do reto, mas, também, de outras neoplasias. Vários trabalhos demonstraram uma incidência elevada de carcinoma gástrico em famílias com síndrome de Lynch (WATSON e RILEY, 2005), o que conduziu, em 2004, à sua inclusão nos critérios de Bethesda revistos (UMAR *et al*, 2004). O risco de carcinoma gástrico de tipo intestinal parece ser quatro vezes superior nas famílias com síndrome de Lynch do que na população em geral.

Em relação à patogênese do CG que se desenvolve em famílias com síndrome de Lynch o problema reside em saber se este é causado pelo mesmo defeito genético da síndrome de Lynch (mutação germinativa de um gene do sistema *Mismatch Repair*, MMR) ou correspondem à agregação de CG esporádico em famílias com síndrome de Lynch (CARNEIRO *et al*, 2008).

Recentemente se identificaram mutações somáticas de genes do tipo MMR em carcinomas gástricos esporádicos com instabilidade de microsátélites (IMS) (PINTO *et al*, 2008). Anteriormente tinham sido identificados casos de CG familiar

com IMS e mutações de genes do tipo MMR (*hMLH1*) (KELLER *et al*, 1996) Estas observações reforçam a complexidade da análise de famílias com câncer gastrointestinal associado a alterações do sistema MMR e IMS.

A polipose adenomatosa familiar (PAF) é uma síndrome autossômica dominante muito rara caracterizada pelo aparecimento de múltiplos adenomas na mucosa cólica com um risco de 100% de desenvolverem carcinomas em idades jovens, sendo causada por mutações truncantes do gene supressor tumoral da polipose adenomatosa cólica (OLIVEIRA; SERUCA e CALDAS, 2003). Foi descrita uma associação com carcinomas gástricos em famílias japonesas com PAF, mas não foi demonstrado em famílias ocidentais (RODRIGUES *et al*, 2009).

A síndrome de Peutz-Jeghers caracteriza-se pela existência de pólipos hamartomatosos gastrointestinais associados à inativação do gene serina/treonina kinase, *STK1/LKB1* (OLIVEIRA; SERUCA e CALDAS, 2003; SHINMURA *et al*, 2005). Esta síndrome associa-se a pólipos gástricos podendo estar aumentada a suscetibilidade para o desenvolvimento de neoplasias.

A síndrome de Cowden é uma doença autossômica dominante caracterizada pela existência de múltiplas lesões hamartomatosas, podendo ocorrer pólipos no cólon, intestino delgado e estômago (BROWNSTEIN; MEHREGAN e BILOWSKI, 1977). Identificaram-se mutações germinativas do gene supressor tumoral *PTEN* em famílias com a síndrome de Cowden, mas nem todos os hamartomas mostram LOH no locus *PTEN* (LIAW *et al*, 1997).

A síndrome de Li-Fraumeni é uma doença rara autossômica dominante que se caracteriza por neoplasias mesenquimatosas e epiteliais em diversos locais. Mutações germinativas do *TP53* foram encontradas em quase 70% das famílias com a síndrome de Li-Fraumeni (VARLEY *et al*, 1997). Alguns estudos fazem uma associação com os carcinomas gástricos do tipo intestinal e difuso.

Com base nessas informações, conclui-se que são necessárias pesquisas dirigidas a identificar novos alvos genéticos vinculados ao desenvolvimento do CGDH (BAPTISTA, 2010). No futuro deverão ser desenvolvidos esforços no sentido de:

a) melhorar a capacidade de rastreio de lesões nos indivíduos portadores de mutações *CDH1*;

- b) identificar as alterações genéticas envolvidas num número significativo de casos de CGHD que não apresentam mutações diagnosticáveis;
- c) de avaliar o significado das mutações *missensses*;
- d) de melhor compreender os mecanismos subjacentes à inativação do segundo “*hit*”;
- e) de reconhecer eventuais fatores ambientais e outros mecanismos patogênicos que possam interferir nas mutações e;
- f) de compreender as diferenças e relações entre carcinomas familiares e esporádicos.

6 CONCLUSÕES

- a) Este é o primeiro estudo no Brasil, de centro único, a investigar as alterações germinativas no gene *CDH1* de pacientes com critérios clínicos de câncer gástrico difuso hereditário.
- b) No grupo de pacientes com CGD diagnosticados antes dos 45 anos de idade (EODGC) identificamos uma mutação germinativa do tipo *missense* 1037A>C no éxon 8 do gene *CDH1*. Esta frequência (9,1%) é similar aos dados previamente publicados para este grupo de pacientes.
- c) Os nossos resultados e os dados da literatura suportam a noção de que as alterações germinativas no gene *CDH1* são responsáveis apenas por uma pequena fração de casos CGD em pacientes jovens (<45 anos) com ou sem história familiar de CG. Contudo sendo este o único defeito genético descrito, o teste molecular para análise de mutações e deleções no *CDH1* parece ser pertinente e deve ser indicado também para estes pacientes.
- d) Uma análise preliminar baseada em informações disponíveis da estrutura cristalográfica da E-caderina, demonstrou que a mutação *missense* 1037A>C, que substitui uma glutamina por prolina no códon 346, pode potencialmente causar perturbações na estrutura da fita β na região EC-2 do domínio extracelular da proteína E-caderina.
- e) No grupo de pacientes com CGD e história familiar de CG não foram identificadas alterações germinativas do *CDH1*.
- f) Não foram identificadas grandes deleções e/ou inserções germinativas na região codificante do gene *CDH1* pela metodologia de MLPA, em nenhum dos pacientes com CGD analisados.
- g) No grupo de pacientes com CGD foram identificados cinco polimorfismos do tipo SNPs (48+6T>C; 531+10G>C; 943C>G; 1849G>A; 1896C>T; 2253C>T), previamente publicados.
- h) No grupo de pacientes com CGD identificamos uma deleção intrônica polimórfica de 13 pb (48+63-5del) não descrita previamente, em 3 probandos

não relacionados e confirmada em uma população de doadores voluntários utilizada como controle. A frequência alélica desta variante deletada é 0,09.

- i) A expressão de E-caderina, analisada por imunohistoquímica em material tumoral correspondente ao diagnóstico de CGD, foi confirmada em 10 dos 14 casos de CGD analisados, sendo que em 4 casos menos de 50% das células tumorais apresentaram expressão forte ou moderada. Em dois pacientes com CGD as células tumorais não apresentaram expressão da E-caderina.

7 REFERÊNCIAS

AI-HAJJ, M e CLARKE MF. **Self-renewal and solid tumor stem cells**. *Oncogene* 23: 7274-7282, 2004.

ASCAÑO, JJ *et al.* **Inactivation of the E-cadherin gene in sporadic diffuse-type gastric cancer**. *Mod. Pathol.*,10: 942-949, 2001.

BACANI, JT *et al.* **CDH1/E-cadherin germline mutations in early-onset gastric cancer**. *J Med Genet*, 43:867–872, 2006.

BAPTISTA, M. **Carcinoma Gástrico Difuso Hereditário – Artigo de Revisão**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2010.

BARBER, M; FITZGERAL, RC e CALDAS, C. **Familial gastric cancer – a etiology and pathogenesis**. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 20(4):721-734, 2006.

BASTOS, J *et al.* **Dietary patterns and gastric cancer in a Portuguese urban population**. *Int J Cancer*, 127(2):433-441, 2010.

BD. BIOLOGICAL DATABASE. Disponível em: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=CDH1>. Acesso em: janeiro/2013.

BECKER, KF *et al.* **E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas**. *Cancer Res*, 54:3845–3852, 1994.

BENEDETTI, A; PARENT, ME e SIEMIATYCKI, J. **Lifetime consumption of alcoholic beverages and risk of 13 types of cancer in men: results from a case-control study in Montreal**. *Cancer Detect Pre*, 32(5-6):352-362, 2009.

BERX, G e ROY, F. **Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer**. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(6): a003129, 2009.

BERX, G *et al.* **Mutations of the human E-cadherin (*CDH1*) gene.** Hum Mutat, 12(4):226-237, 1998.

BEVAN, S e HOUSTON, RS. **Genetic predisposition to gastric cancer.** Q. J. M., 92(1): 5-10,1999.

BLAIR, VR. **Familial gastric cancer: genetics, diagnosis, and management.** Surg Oncol Clin N Am, 21(1):35-56, 2012.

BLAIR, VR *et al.* **Hereditary diffuse gastric cancer: diagnosis and management.** Clin Gastroenterol Hepatol, 4:262-275, 2006.

BONEQUI, P *et al.* **Risk factors for gastric cancer in Latin America: a meta-analysis.** Cancer Causes Control, 24(2):217-231, 2013.

BOSMAN, FT *et al.* **WHO classification of tumours of the digestive system**, 4th edition. Lyon, France: IARC, 2010.

BOUVARD, V *et al.* **A review of human carcinogens-part b biological agents.** Lancet Oncol, 10:321–322, 2009.

BOYLE, P e LEVIN, B. **World Cancer Report 2008.** IARC, 510p. 2008.

BRENNER, H *et al.* **Individual and joint contribution of family history and *Helicobacter pylori* infection to the risk of gastric carcinoma.** Cancer, 88(2): 274-279, 2000.

BROOKS-WILSON, AR *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, 41(7):508-517, 2004.

BROWNSTEIN, MH, MEHREGAN, AH e BILOWSKI, JB – **Trichilemmomas in Cowden's disease.** JAMA, 238(1):26, 1977.

CALDAS, C *et al.* **Familial gastric cancer: overview and guidelines for management.** J Med Genet, 36: 873-880, 1999.

CANEDO, P; FIGUEIREDO, C e MACHADO, JC. **After Helicobacter pylori, genetic susceptibility to gastric carcinoma revisited.** Helicobacter 12 (Suppl2), 45–49, 2007.

CARNEIRO, F *et al.* **E-cadherin changes in gastric carcinoma.** Histopathology, 35:477– 478, 1999.

CARNEIRO, F *et al.* **Molecular pathology of familial gastric cancer, with an emphasis on hereditary diffuse gastric cancer.** J Clin Pathol, 61(1):25-30, 2008.

CARNEIRO, F *et al.* **Pathology and genetics of familial gastric cancer.** Int J Surg Pathol, 18: 35S-36S, 2010.

CARNEIRO, P *et al.* **E-cadherin dysfunction in gastric cancer - cellular consequences, clinical applications and open questions.** FEBS Lett, 586(18):2981-2989, 2012.

CHAN, AO. **E-cadherin in gastric cancer.** World J. Gastroenterol, 2: 199-203, 2006.

COMPARE, D *et al.* **Risk factors in gastric cancer.** Eur Rev Med Pharmacol Sci, 14(4):302-308, 2010.

CORSO, G *et al.* **E-cadherin genetic screening and clinico-pathologic characteristics of early onset gastric cancer.** Eur J Cancer, 47(4):631-639, 2011.

CORSO, G *et al.* **Frequency of CDH1 germline mutations in gastric carcinoma coming from high- and low-risk areas: metanalysis and systematic review of the literature.** BMC Cancer, 12:8, 2012.

CREW, KD e NEUGUT, AI. **Epidemiology of gastric cancer.** World J Gastroenterol, 12(3):354–362, 2006.

CURADO, MP *et al.* **Cancer incidence in five continents**, Vol IX. Lyon, France: IARC Scientific publication, 2007.

DAVID, JM e RAJASEKARAN, AK. **Dishonorable discharge: the oncogenic roles of cleaved e-cadherin fragments**. *Cancer Res*, 72(12):2917-2923, 2012.

DE WEVER, O *et al.* **Soluble cadherins as cancer biomarkers**. *Clin Exp Metastasis*, 24(8):685-697, 2007.

DEN DUNNEN, JT e ANTONARAKIS, SE. **Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion**. *Hum Muta*, 15(1):7-12, 2000. Erratum in: *Hum Mutat*, 20(5):403, 2002.

DONG, QJ *et al.* **Relatedness of *Helicobacter pylori* populations to gastric carcinogenesis**. *World J Gastroenterol*, 18(45):6571-6576, 2012.

DUELL, EJ *et al.* **Alcohol consumption and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort**. *Am J Clin Nutr*, 94(5):1266-1275, 2011.

EVERATT, R *et al.* **Alcohol consumption and risk of gastric cancer: a cohort study of men in Kaunas, Lithuania, with up to 30 years follow-up**. *BMC Cancer*, 12:475, 2012.

FERLAY, J *et al.* **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008**. *Int J Cancer*, 127(12):2893-2917, 2010.

FIGUEIREDO, J *et al.* **The importance of E-cadherin binding partners to evaluate the pathogenicity of E-cadherin missense mutations associated to HDGC**. *Eur J Hum Genet*. 21(3):301-309, 2013.

FITZGERALD, RC *et al.* **Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research**. *J Med Genet* 47:436-444, 2010.

FRANKE, A *et al.* **Alcohol-related diseases of the esophagus and stomach.** Dig Dis, 23(3-4):204-213, 2005.

GONZALEZ, CA e LOPEZ-CARRILLO, L. ***Helicobacter pylori*, nutrition and smoking interactions: their impact in gastric carcinogenesis.** Scand J Gastroenterol, 45:6–14, 2010.

GONZALEZ, CA *et al.* **Fruit and vegetable intake and the risk of gastric adenocarcinoma: a reanalysis of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST) study after a longer follow-up.** Int J Cancer, 131(12):2910-2919, 2012.

GUILFORD, P *et al.* **A short guide to hereditary diffuse gastric cancer.** Hered Cancer Clin Pract, 5(4): 183-194, 2007.

GUILFORD, P *et al.* **E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer.** Nature, 392(6674):402-405, 1998.

GUILFORD, P; HUMAR, B e BLAIR, V. **Hereditary diffuse gastric cancer: translation of *CDH1* germline mutations into clinical practice.** Gastric Cancer, 13:1–10, 2010.

GUMBINER, BM. **Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis.** Nat Rev Mol Cell Biol, 6: 622–634, 2005.

HELICOBACTER AND CANCER COLLABORATIVE GROUP. **Gastric cancer and helicobacter pylori: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts.** Gut, 49:347–353, 2001.

HERRÁIZ, M *et al.* **Accuracy of colonoscopy in localizing colorectal cancer - a quality issue?** Rev Esp Enferm Dig, 104(10):509-511, 2012.

HUBBARD, TJ *et al.* Ensembl 2009. Nucleic Acids Res. Database issue:D690-697, 2009.

HUDLER, P. **Genetic aspects of gastric cancer instability**. Scientific-World Journal, 761909, 2012. <http://dx.doi.org/10.1100/2012/761909>

HUMAR, B e GUILFORD, P. **Hereditary difusse gastric cancer: A manifestation of lots cell polarity**. Cancer Sci, 100(7):1151-1157, 2009.

HUMAR, B *et al.* **E-cadherin deficiency initiates gastric signet-ring cell carcinoma in mice and man**. Cancer Res, 69(5): 2050-2056, 2009.

IACR. **International Agency for Research on Cancer (IARC)**. Disponível em: <http://www.iarc.fr/>. Acesso em janeiro de 2013.

INCA. **ABC do Câncer: Abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro, 129p. 2012. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em janeiro de 2013.

INCA. **Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 118p. 2011. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em janeiro de 2013.

JAKUBOWSKA, A *et al.* **CDH1 gene mutations do not contribute in hereditary diffuse gastric cancer in Poland**. Fam Cancer, 9(4):605-608, 2010.

JAROSZ, M *et al.* **Impact of diet on long-term decline in gastric cancer incidence in Poland**. World J Gastroenterol, 17(1):89-97, 2011.

JEMAL, A *et al.* **Global Cancer Statistics**. CA Cancer J Clin, 61(2):69-90, 2011.

JEURNINK, SM *et al.* **Variety in vegetable and fruit consumption and the risk of gastric and esophageal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST)**. Int J Cancer, 131(6):E963-E973, 2012.

JONES, EG. **Familial gastric cancer**. N.Z. Med. J., 63: 287-290, 1964.

KAURAH, P *et al.* **Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer.** JAMA, 297(21):2360-2372, 2007.

KELLER, G *et al* – **Analysis for microsatellite instability and mutations of the DNA mismatch repair gene hMLH1 in familial gastric cancer.** Int. J. Cancer, 68(5): 571-576, 1996.

KELLEY, JR e DUGGAN, JM. **Gastric cancer epidemiology and risk factors.** J Clin Epidemiol, 56:1-9, 2003.

KIM, S *et al.* **Searching for E-cadherin gene mutations in early onset diffuse gastric cancer and hereditary diffuse gastric cancer in Korean patients.** Fam Cancer. (Epub ahead of print), 2012.

KLUIJT, I *et al.* **CDH1-related hereditary diffuse gastric cancer syndrome: clinical variations and implications for counseling.** Int J Cancer, 131(2):367-376, 2011.

KNUDSON, AG. **Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.** Proc Natl Acad Sci, 68(4):820-823, 1971.

KOBIELAK, A e FUCHS, E. **Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics.** Nat Rev Mol Cell Biol. Review. 5(8): 614-625, 2004.

KOIZUMI, Y *et al.* **Cigarette smoking and risk of gastric cancer: a pooled analysis of two prospective studies in Japan.** Int J Cancae, 112:1049-1055, 2004.

LADEIRAS-LOPES, R *et al.* **Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies.** Cancer Causes Control, 19:689–701, 2008.

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 Pathol Microbiol Scand, 64:31–49, 1965.

LIAW, D. *et al.* **Germine mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome.** Net. Genet, 16(1): 64-67, 1997.

LUGLI, A *et al.* **Napoleon Bonaparte's gastric cancer: a clinicopathologic approach to staging, pathogenesis, and etiology.** *Nature Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 4(1):52-57, 2007.

LYNCH, HT *et al.* **Gastric cancer: new genetic developments.** *J Surg Oncol*, 90: 114–133, 2005

MACHADO, JC *et al.* **E-cadherin gene (*CDH1*) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma.** *Oncogene*, 20:1525–1528, 2001.

MACHADO, JC *et al.* **Interleukin 1-b and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma.** *Gastroenterology*, 121(4): 823-829, 2001.

MAJEWSKI, I *et al.* **An alpha-E-Catenin (*CTNNA1*) mutation in hereditary diffuse gastric cancer.** *J Pathol*, DOI: 10.1002/path 4152, 2012.

MASTORAKI, A *et al.* **Prophylactic total gastrectomy for hereditary diffuse gastric cancer. Review.** *Surg Oncol*. 20(4):223-226, 2011.

MIKKO, S. **Interactions of alcohol and tobacco in gastrointestinal cancer.** *J Gastroenterol Hepatol*, 2:135-139, 2012.

MILNE, AN *et al.* **Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer.** *Hum Genet*, 126: 615-618, 2009.

MS. **Ministério da Saúde, Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde.** Departamento de Análise da Situação de Saúde. Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em janeiro de 2013.

MURATA, A *et al.* **Prospective cohort study evaluating the relationship between salted food intake and gastrointestinal tract cancer mortality in Japan.** *Asia Pac J Clin Nutr*, 19(4):564-571, 2010.

NCI. **Nacional Cancer Society (NCI)**. Disponível em: <http://www.cancer.gov>. Acesso em janeiro de 2013.

NORTON, JA *et al.* **CDH1 truncating mutations in the E-cadherin gene: an indication for total gastrectomy to treat hereditary diffuse gastric cancer.** Ann Surg, 245: 873–879, 2007.

NOTO, JM *et al.* **Iron Deficiency accelerates *helicobacter pylori* induced carcinogenesis in rodents and humans.** J Clin Invest, 123(1):479-492, 2013.

OLIVEIRA C *et al.* **E-cadherin (CDH1) and p53 rather than SMAD4 and Caspase-10 germline mutation contribute to genetic predisposition in Portuguese gastric cancer patients.** European J. of Cancer. 40, 1897-1903, 2004.

OLIVEIRA, C *et al.* **Quantification of epigenetic and genetic 2nd hits in CDH1 during hereditary diffuse gastric cancer syndrome progression.** Gastroenterology, 136:2137-2148, 2009 a.

OLIVEIRA, C *et al.* **Germline CDH1 deletions in hereditary diffuse gastric cancer families.** Human molecular genetics, 18(9):1545-1555, 2009 b.

OLIVEIRA, C *et al.* **Genetics, pathology, and clinics of familial gastric cancer.** Int J Surg Pathol, 14:21–33, 2006.

OLIVEIRA, C; SERUCA, R e CALDAS, C. – **Genetic screening for hereditary diffuse gastric cancer.** Exp. Rev. Mol. Diagn, 3: 201-215, 2003.

OLIVEIRA, C; SERUCA, R e CARNEIRO, F. **Hereditary gastric cancer.** Best Prat. and Res. Cl. Gastroent., 23: 147-157, 2009.

PALLI, D *et al.* **Family history and risk of stomach câncer in Italy.** Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev, 3(1): 15-18, 1994.

PAREDES, J *et al.* **Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer.** Biochim Biophys Acta, 1826:297–311, 2012.

PARK, JM *et al.* **Gastric cancer histology: clinicopathologic characteristics and prognostic value.** J Surg Oncol, 98(7):520-525, 2008.

PEDRAZZANI, C *et al.* **E-cadherin and hereditary diffuse gastric cancer - Clinical review.** Surgery, 142(5):645-657, 2007.

PELETEIRO, B. **Salt intake and gastric cancer risk according to Helicobacter pylori infection, smoking, tumour site and histological type.** Br J Cancer, 104:198–207, 2011.

PIMENTEL-NUNES, P *et al.* **Helicobacter pylori induces increased expression of toll-like receptors and decreased toll-interacting protein in gastric mucosa that persists throughout gastric carcinogenesis.** Helicobacter, 18(1):22-32, 2013.

PINTO, M *et al.* **Somatic mutations in mismatch repair genes in sporadic gastric carcinomas are not a cause but a consequence of the mutation phenotype.** Cancer Genet. Cytogenet., 180: 110-114, 2008.

POURFARZI, F *et al.* **The role of diet and other environmental factors in the causation of gastric cancer in Iran - A population based study.** Int J Cancer, 125(8):1953-1960, 2009.

PRINZ, C; SCHWENDY, S e VOLAND, P. **H. pylori and gastric cancer: shifting the global burden.** World J Gastroenterol, 12(34):5458–5464, 2006;

RIZZATO, C *et al.* **Risk of advanced gastric precancerous lesions in Helicobacter pylori infected subjects is influenced by ABO blood group and cag A status.** Int J Cancer, 2013. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.28019>.

RODRIGUES, P *et al.* **Cancer gástrico familiar.** Ver. Port. Cirurg, 8: 11-24, 2009.

RODRIGUEZ, FJ; LEWIS-TUFFIN, LJ e ANASTASIADIS, PZ. **E-cadherin's dark side: possible role in tumor progression.** Biochim Biophys Acta, 826(1):23-31, 2012.

RODRIGUEZ-SANJUAN, JC *et al.* **A novel mutation in the E-cadherin gene in the first family with hereditary diffuse gastric cancer reported in Spain.** Eur J Surg Oncol, 32(10):1110-1113, 2006.

ROSA, I *et al.* **Importância e caracterização do carcinoma gástrico em família com o diagnóstico ou suspeita de síndrome de Lynch.** J. Port. Gastroenterol., 15: 56-62, 2008.

SA. Sigma-Aldrich® Co. LLC. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com>.

SCHRADER, KA *et al.* **Hereditary diffuse gastric cancer: association with lobular breast cancer.** Fam Cancer, 7(1):73-82. 2008.

SCHUETZ, J *et al.* **Catenin family genes are not commonly mutated in hereditary diffuse gastric cancer.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 21(12): 2272-2274. 2012.

SERENO, M *et al.* **Gastric tumours in hereditary cancer syndromes: clinical features, molecular biology and strategies for prevention.** Clin Transl Oncol. Review. 13(9): 599-610, 2011.

SHAW, D *et al.* **Chromoendoscopic surveillance in hereditary diffuse gastric cancer: an alternative to prophylactic gastrectomy?** Gut, 54:461-468, 2005.

SHIHMURA, K *et al.* **A novel Stk11 germline mutation in two siblings with Peutz-Jeghers syndrome complicated by primary gastric cancer.** ClinicalGenet, 67: 81-86, 2005.

SHINMURA, K *et al.* **Characterization of centrosomal association of nucleophosmin/B23 linked to Crm1 activity.** FEBS Lett., 579(29):6621-6634, 2005.

SIMÕES-CORREIA, J *et al.* **E-cadherin destabilization accounts for the pathogenicity of missense mutations in hereditary diffuse gastric cancer.** PLoS One, 7(3):e33783, 2012.

STEFANOFF, CG e FERRERA, MA.– **Síndromes de Câncer Hereditário / Câncer Gástrico Difuso Hereditário**. In: Oncologia Molecular, cap. 30.1, 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

STEMMLER, MP. **Cadherins in development and cancer**. Mol Biosyst, 4(8):835-850, 2008.

SUERBAUM, S e MICHETTI, P. ***Helicobacter pylori* infection**. N Engl J Med, 347:1175–1186, 2002.

SURIANO, G *et al.* **Characterization of a recurrent germline mutation of the E-cadherin gene: implications for genetic testing and clinical management**. Clin Cancer Res, 11(15):5401–5409, 2005.

SURIANO, G *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, 12(5):575-582, 2003.

SURIANO, G *et al.* **A model to infer the pathogenic significance of CDH1 germline missense variants**. J Mol Med, 84(12):1023-3, 2006.

TESTINO, G; TESTINO, R e ANCARANI, AO. ***Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis**. Recenti Prog Med, 92(10):573-577, 2001.

TIAN, X *et al.* **E-cadherin/beta-catenin complex and the epithelial barrier**. J Biomed Biotechnol, 2011.

TSUKAMOTO, T *et al.* ***Helicobacter pylori* infection and gastric carcinogenesis in rodent models**. Semin Immunopathol, 35(2):177-190,2013.

UMAR, A *et al.* **Revised Bethesda Guidelines for Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability**. J. Nat. Canc. Inst., 96(4): 261-268, 2004.

VAN AKEN, E *et al.* **Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer.** Virchows Arch, 439(6): 725-751, 2001

VAN ROY, F e BERX, G. **The cell-cell adhesion molecule E-cadherin.** Cell Mol Life Sci, 65:3756–3788, 2008.

VARLEY, JM *et al.* **Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended studie of 39 families.** Cancer Res, 57(15): 3245-3252, 1997.

VOGELAAR, I *et al.* **Familial gastric cancer: detection of a hereditary cause help to understand its etiology.** Hered Cancer Clin Pract, 10(1):18, 2012.

WANG, Z *et al.* **ABO blood group system and gastric cancer: a case-control study and meta-analysis.** Int J Mol Sci, 13(10):13308-13321, 2012.

WATSON, P e RILEY, B. – **The tumor spectrum in the Lynch syndrome.** Familial Cancer, 4: 245-248, 2005.

WHO. **World Health Organization (WHO).** Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em janeiro de 2013.




YABUTA, T *et al.* **E-cadherin gene variants in gastric cancer families whose probands are diagnosed with diffuse gastric cancer.** Int J Cancer, 10;101(5):434-441, 2002.

YAMADA, H *et al.* **Identification and characterization of novel germline p53 mutation in familial gastric cancer in the Japanese population.** Carcinogenesis. 28(9): 2013-2018, 2007.



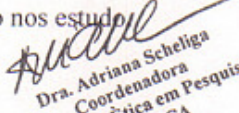
YAMADA, H *et al.* **Germline alterations in the CDH1 gene in familial gastric cancer in the Japanese population.** Cancer Sci, 102(10):1782-1788, 2011.

8 ANEXOS

8.1 CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP-INCA (nº 022/08)

	
Memo 143/08-CEP-INCA	Rio de Janeiro, 12 de maio de 2008.
A(o): Dr(a). Maria Aparecida Ferreira Pesquisador(a) Principal	
Registro CEP nº 022/08 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto) Título do Projeto: "Implantação do grupo interdisciplinar de estudo em câncer gástrico difuso hereditário – Análise de mutações germinativas no gene CDH1 em indivíduos com câncer gástrico difuso hereditário"	
Prezado Pesquisador,	
Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer aprovou após re-análise, o protocolo intitulado: Implantação do grupo interdisciplinar de estudo em câncer gástrico difuso hereditário – Análise de mutações germinativas no gene CDH1 em indivíduos com câncer gástrico difuso hereditário , bem como o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (versão 1.0 de 12/05/08), em 12 de maio de 2008.	
Ressalto que conforme descrito na folha de rosto (item 49), o pesquisador responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu protocolo que estão previstos para as seguintes datas: <i>Novembro/2008 e Maio/2009</i> .	
A documentação pertinente será encaminhada a CONEP com vistas a registro e arquivamento.	
Atenciosamente  Dra. Adriana Scheliga Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa CEP-INCA	
C/c – Dr. Gilberto Reinaldo Mansur – Chefe do Serviço de Endoscopia Digestiva do INCA	

8.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

 
<p style="text-align: center;">TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</p> <p style="text-align: center;">Estudo prospectivo multidisciplinar de pacientes com critérios para câncer gástrico difuso hereditário (CGDH): manejo clínico, análise de mutações germinativas no gene <i>CDH1</i> e aconselhamento genético</p>
Nome do Voluntário: _____
<p>Você está sendo convidado a participar deste estudo porque você tem o diagnóstico clínico ou tem uma suspeita clínica de haver algum risco para o Câncer Gástrico Difuso Hereditário (CGDH). O CGDH já é bem estudado, sendo causado por um defeito em uma região do material genético (ou DNA) chamada de "gene <i>CDH1</i>".</p> <p>Para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, a seguir serão esclarecidos os objetivos, e o que será feito no seu material genético, a fim de que todas as informações importantes sejam explicadas. E assim, você possa tomar sua decisão conhecendo todos os benefícios, riscos e implicações. Caso tenha alguma dúvida ou não entender algo, por favor, pergunte novamente até que tenha compreendido tudo.</p>
<p>OBJETIVO DO ESTUDO</p> <p>Este estudo tem como objetivo identificar o defeito no gene <i>CDH1</i>, o causador do câncer gástrico difuso hereditário, através da análise do seu material genético extraído do seu sangue e da peça cirúrgica da qual foi feito o diagnóstico de seu tumor de estômago</p>
<p>PROCEDIMENTOS DO ESTUDO</p> <p>Você foi matriculado (a) no serviço de cirurgia abdomino-pélvica porque você tem um tumor no estômago. O diagnóstico foi feito através de uma endoscopia digestiva alta que você já realizou, e que mostrou que o tumor é chamado de adenocarcinoma. Após você ler este termo de consentimento, e se você der o seu consentimento, faremos o seu heredograma. O Heredograma é um tipo de gráfico que representa a herança genética de determinada característica dos indivíduos. É muito semelhante a uma árvore genealógica, que mostra quem são os seus pais, e os pais de seus pais. Se neste gráfico, você preencher os critérios clínicos que nos levem a suspeitar de síndrome de câncer gástrico difuso hereditário, você poderá ser incluído nos estudos.</p>
<p style="text-align: right;"> Dra. Adriana Scheliga Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa CEP-INCA</p>
<p>Prot. 022/08 - Implantação do grupo interdisciplinar de estudo em câncer gástrico difuso hereditário - Análise de mutações germinativas no gene <i>CDH1</i> em indivíduos com câncer gástrico difuso hereditário - versão 2 - Aprovado em 12/5/08</p>
1

O teste será realizado no laboratório do Banco Nacional de Tumores e DNA, no Instituto Nacional do Câncer onde o seu material genético ficará armazenado. Caso haja necessidade de alguma outra avaliação, você será chamado para uma nova autorização.

Além disto, serão coletadas algumas informações do seu prontuário, como idade, sexo, localização dos tumores, e tratamentos que você já fez. Essas informações servirão para a criação de um registro no INCA de famílias com CGDH.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Não existem métodos alternativos a sua participação neste estudo. Caso você não queira participar, nenhuma amostra será coletada ou analisada, bastando para isso, que you não assine este Termo de Consentimento. Seu acompanhamento ou tratamento não será modificado pelo fato de você não querer participar deste estudo.

RISCOS

O teste genético será feito a partir do material genético extraído do seu sangue. A coleta de sangue será feita na veia do braço com uma agulha, sendo retirado o equivalente a duas colheres de sopa de sangue quando a veia for puncionada. Os riscos são de dor no local da punção, manchas roxas (ou também chamadas de equimoses) e raramente infecção no local. O sangue para o presente estudo só será colhido após você ler este termo e consentir em participar.


BENEFÍCIOS

Pode ser que não exista nenhum benefício direto a você, pela participação neste estudo. Porém este estudo poderá ser importante para você e seu médico entenderem o tipo de alteração genética que causa a doença.

O teste positivo confirma a presença da mutação e alertará o seu médico para investigar seus familiares; já o teste negativo afasta o risco da doença e tranqüiliza a pessoa em relação aos filhos e descendentes.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Durante o estudo o seu acompanhamento será feito pelo seu médico, que é o responsável pela sua assistência. Este profissional será informado e terá acesso a todos os resultados deste estudo, e irá comunicar a você os resultados caso você deseje.



Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

É importante que você saiba que os registros médicos e resultados deste estudo são confidenciais e estarão disponíveis para serem consultados apenas pela equipe de saúde que cuidará de você, pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer - INCA e pela equipe de pesquisadores envolvidos. Em hipótese alguma seu nome será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Este estudo não implica em danos adicionais para a sua saúde. O estudo será feito no material genético extraído do seu sangue, como anteriormente explicado. Apenas uma coleta adicional de sangue será solicitado, dentro do período de coleta de outros exames que normalmente são feitos durante o tratamento de qualquer pessoa que tem câncer. Todo e qualquer dano que seja relacionado a este estudo e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da sua instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação no estudo.

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento a você pela sua participação no estudo.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante saber que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e o material utilizado para a análise genética será interrompida, e nenhum dado do seu material ou de seu prontuário será utilizado.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a **Dra Maria Aparecida Ferreira** no telefone **(21) 25066226**. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante desta pesquisa, também pode contar com uma terceira pessoa imparcial, a Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional do Câncer **Dra. Adriana Scheliga** - Rua André Cavalcanti 37, telefone 21 – 3233-1410.

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas.

Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.


_____/_____/_____
(Assinatura do Paciente) dia mês ano

(Nome do Paciente – letra de forma)

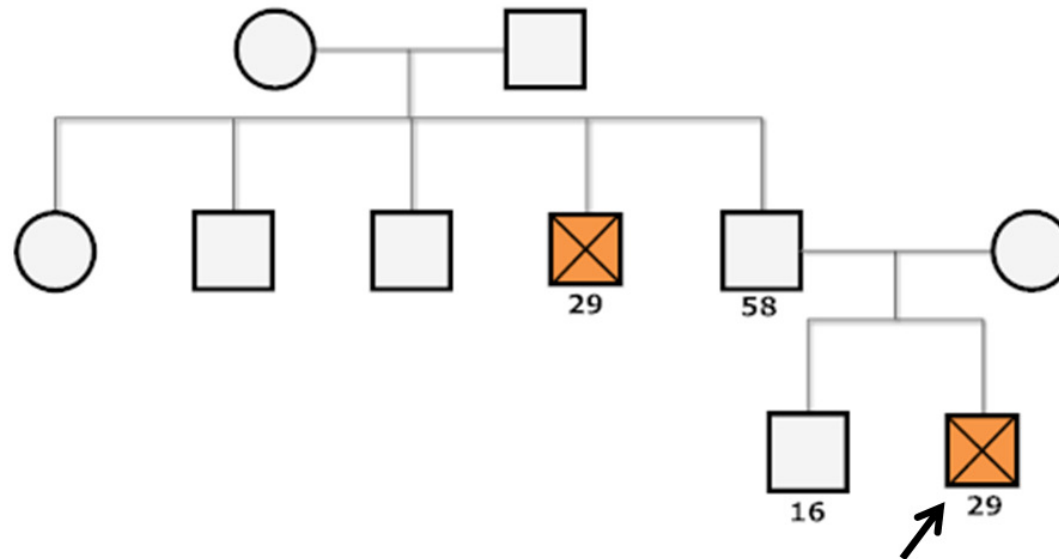
_____/_____/_____
(Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano





Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

_____/_____/_____
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano


Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

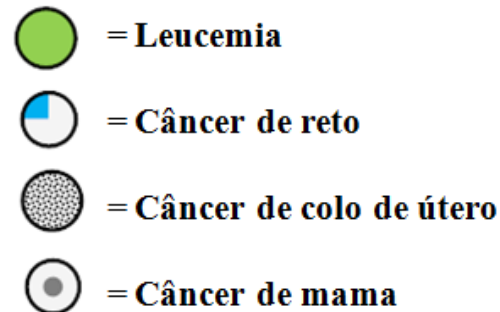
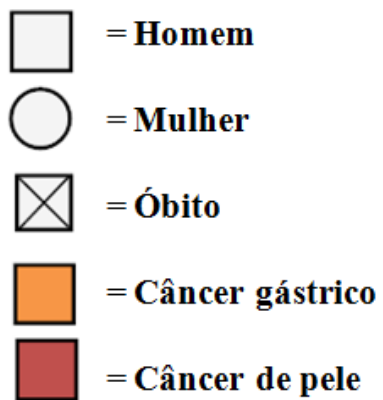
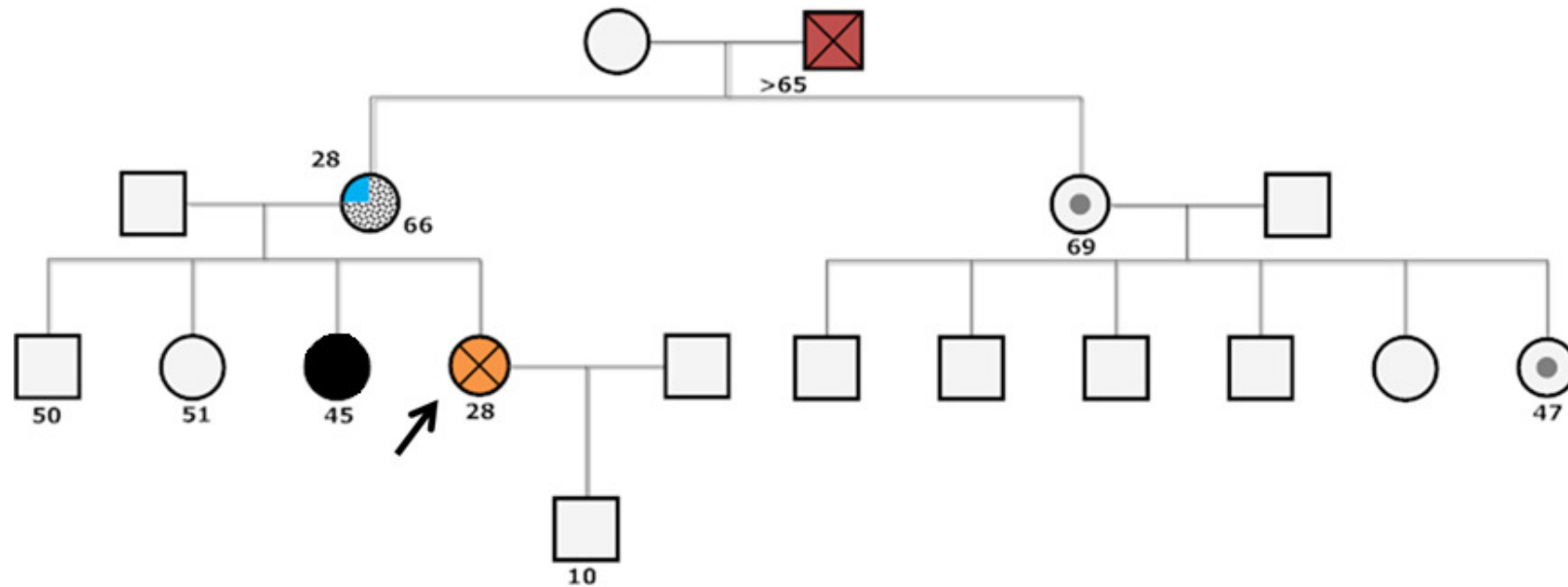
8.3 HEREDOGRAMA – PACIENTE 1.



-  = **Homem**
-  = **Mulher**
-  = **Óbito**
-  = **Câncer gástrico**

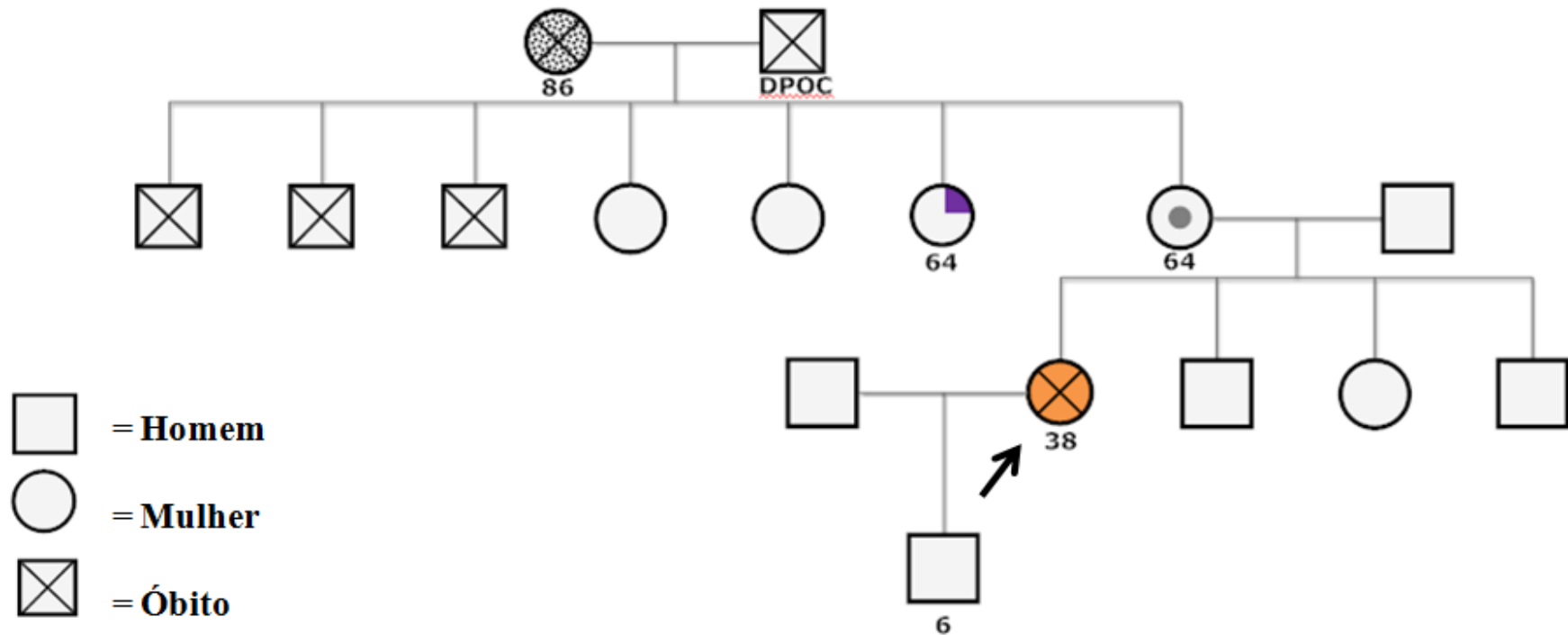
- Indivíduo com tumor: idade no momento do diagnóstico.
- Indivíduo sem tumor: idade no momento de confecção do heredograma
- Indivíduo sem tumor e falecido: idade no momento do óbito.








8.4 HEREDOGRAMA – PACIENTE 2.



- Indivíduo com tumor: idade no momento do diagnóstico.
- Indivíduo sem tumor: idade no momento de confecção do heredograma
- Indivíduo sem tumor e falecido: idade no momento do óbito.

8.5 HEREDOGRAMA – PACIENTE 9.

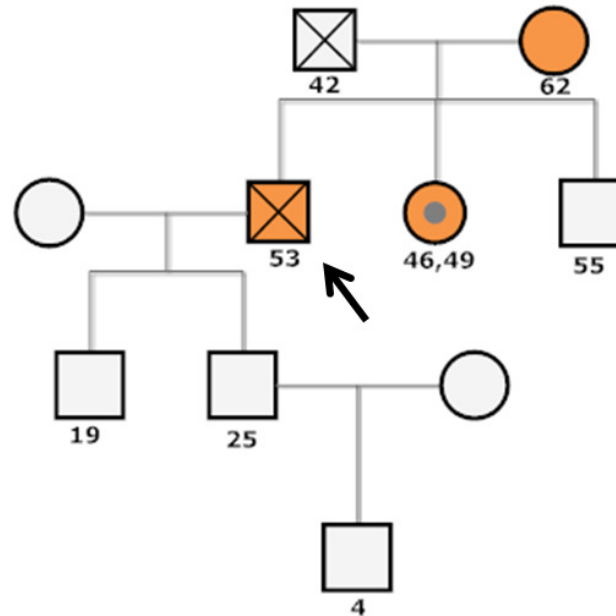







-  = **Homem**
-  = **Mulher**
-  = **Óbito**
-  = **Câncer gástrico**
-  = **Câncer de mama**
-  = **Câncer de rim**
-  = **Câncer de colo de útero**

DPOC = Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

- Indivíduo com tumor: idade no momento do diagnóstico.
- Indivíduo sem tumor: idade no momento de confecção do heredograma
- Indivíduo sem tumor e falecido: idade no momento do óbito.

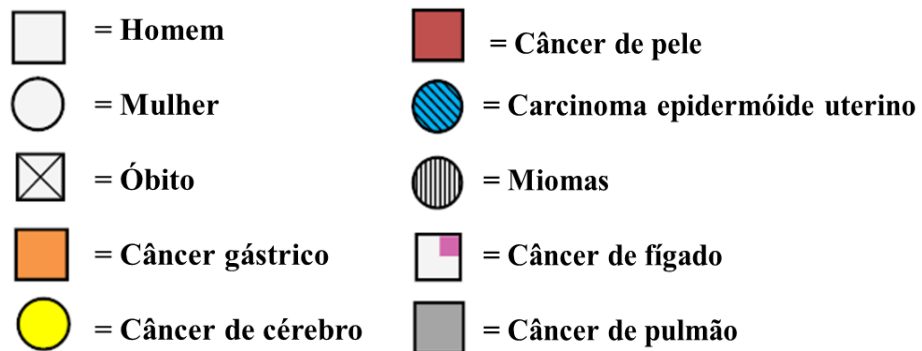
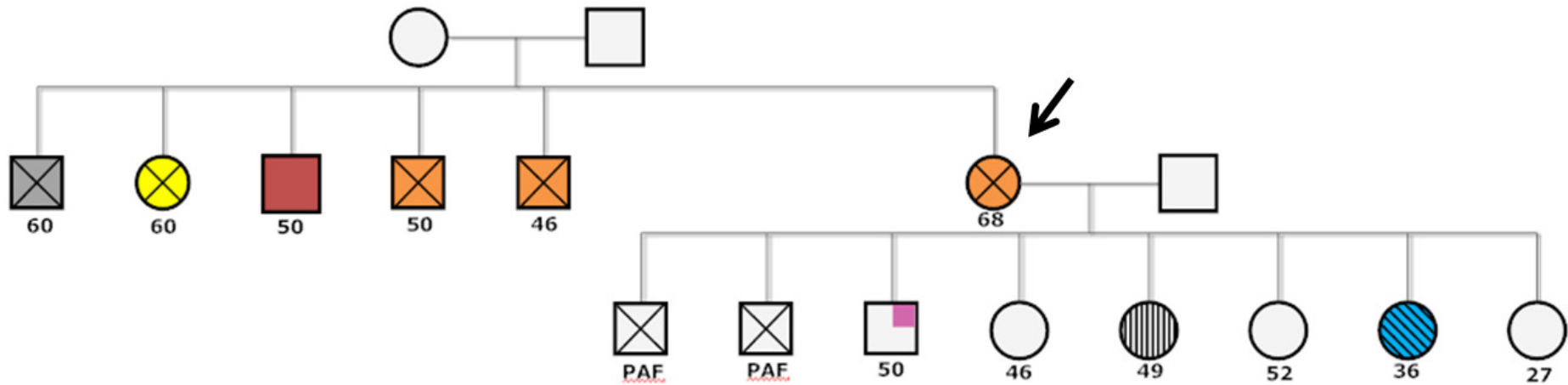
8.6 HEREDOGRAMA – PACIENTE 12.



-  = Homem
-  = Mulher
-  = Óbito
-  = Câncer gástrico
-  = Câncer de mama

- Indivíduo com tumor: idade no momento do diagnóstico.
- Indivíduo sem tumor: idade no momento de confecção do heredograma
- Indivíduo sem tumor e falecido: idade no momento do óbito.

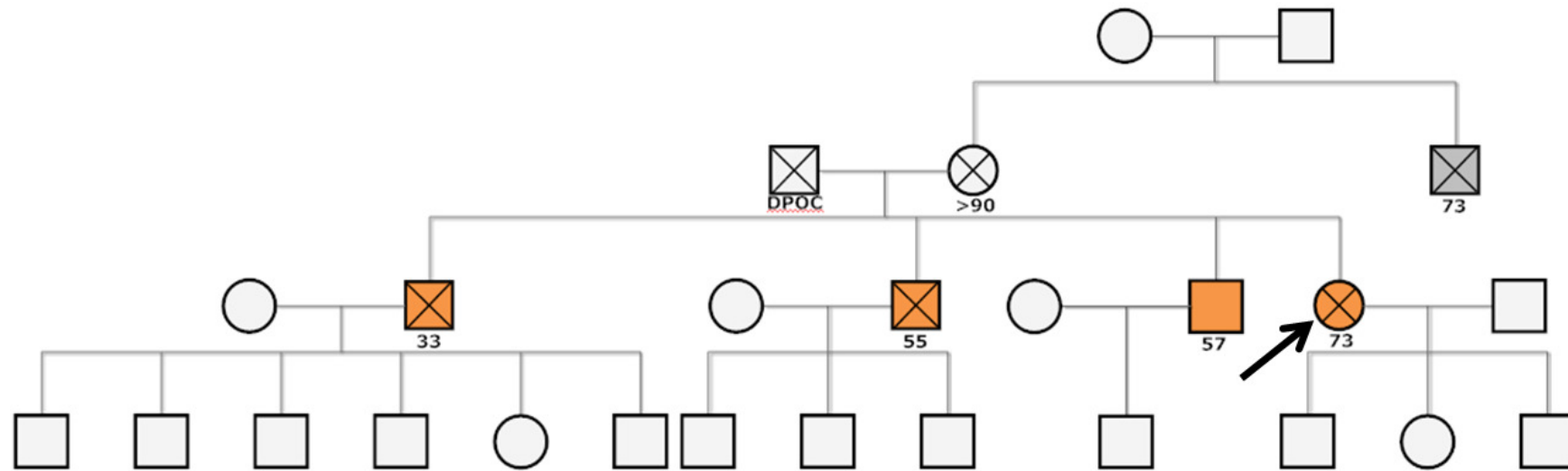
8.7 HEREDOGRAMA – PACIENTE 13.



PAF: perfuração por arma de fogo.

- Indivíduo com tumor: idade no momento do diagnóstico.
- Indivíduo sem tumor: idade no momento de confecção do heredograma
- Indivíduo sem tumor e falecido: idade no momento do óbito.

8.8 HEREDOGRAMA – PACIENTE 14.



□ = Homem

○ = Mulher

⊠ = Óbito

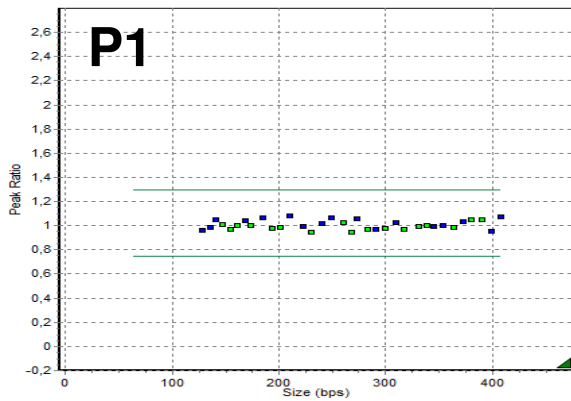
■ = Câncer gástrico

■ = Câncer de pulmão

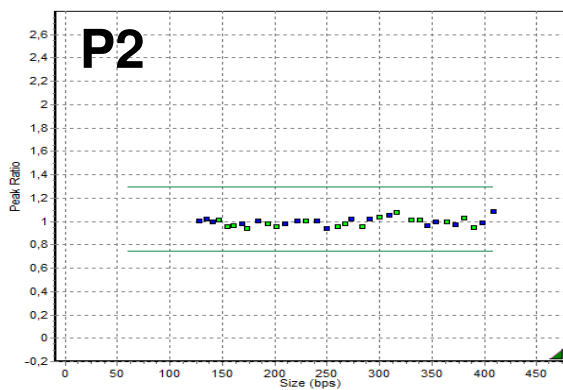
DPOC = Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

- Indivíduo com tumor: idade no momento do diagnóstico.
- Indivíduo sem tumor: idade no momento de confecção do heredograma
- Indivíduo sem tumor e falecido: idade no momento do óbito.

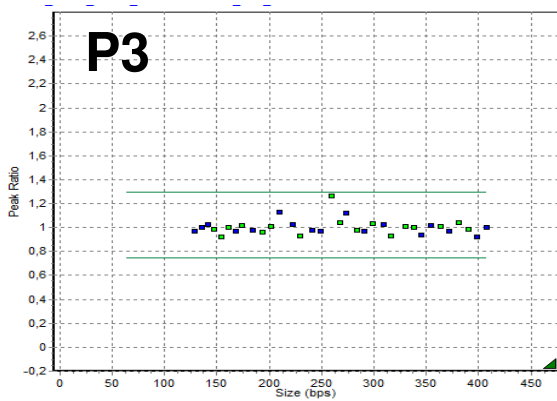
8.9 RESULTADOS DA ANÁLISE DE *MLPA* DE TODOS OS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO. (P = PACIENTE).



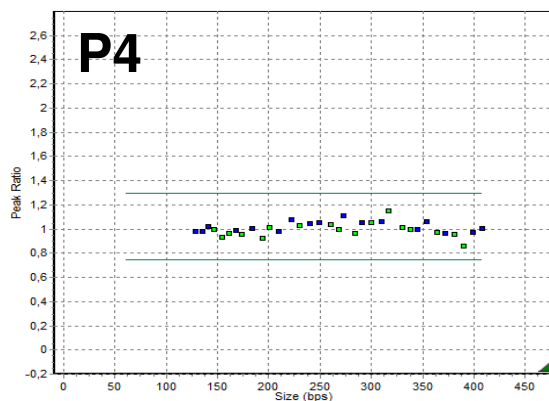
Parâmetros de normalização	
DP do total de sondas	0,038
DP de sondas de controles negativos	0,030
DP de sondas de controle interno	0,040
DP de sondas de amostra teste	0,030



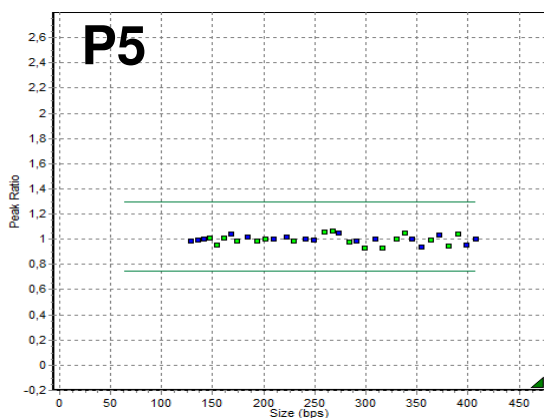
Parâmetros de normalização	
DP do total de sondas	0,036
DP de sondas de controles negativos	0,038
DP de sondas de controle interno	0,035
DP de sondas de amostra teste	0,038



Parâmetros de normalização	
DP do total de sondas	0,066
DP de sondas de controles negativos	0,077
DP de sondas de controle interno	0,056
DP de sondas de amostra teste	0,077

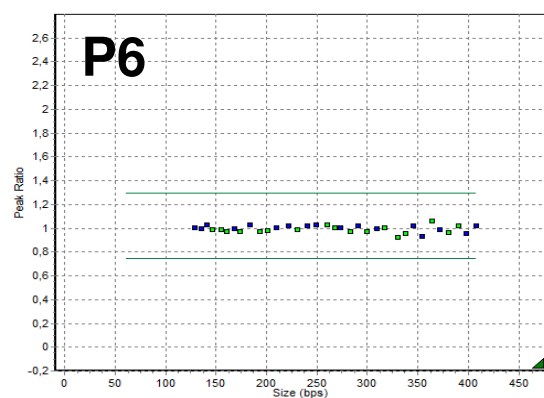


Parâmetros de normalização	
DP do total de sondas	0,055
DP de sondas de controles negativos	0,063
DP de sondas de controle interno	0,043
DP de sondas de amostra teste	0,063



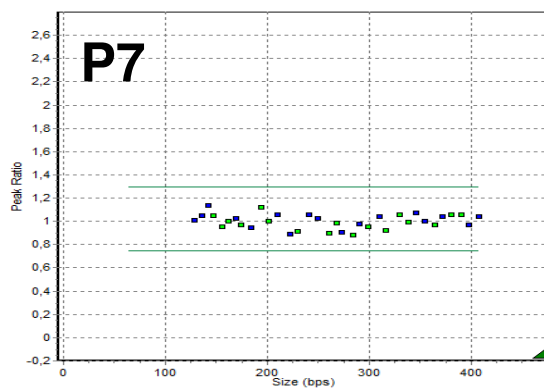
Parâmetros de normalização

DP do total de sondas	0,034
DP de sondas de controles negativos	0,0741
DP de sondas de controle interno	0,027
DP de sondas de amostra teste	0,041



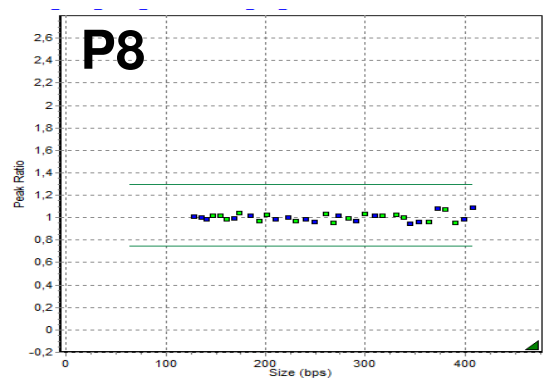
Parâmetros de normalização

DP do total de sondas	0,030
DP de sondas de controles negativos	0,031
DP de sondas de controle interno	0,027
DP de sondas de amostra teste	0,031



Parâmetros de normalização

DP do total de sondas	0,064
DP de sondas de controles negativos	0,065
DP de sondas de controle interno	0,063
DP de sondas de amostra teste	0,065

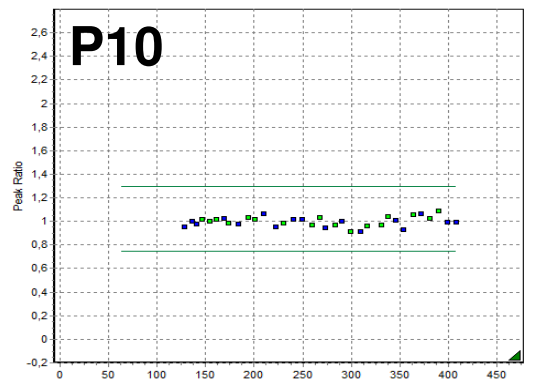


Parâmetros de normalização

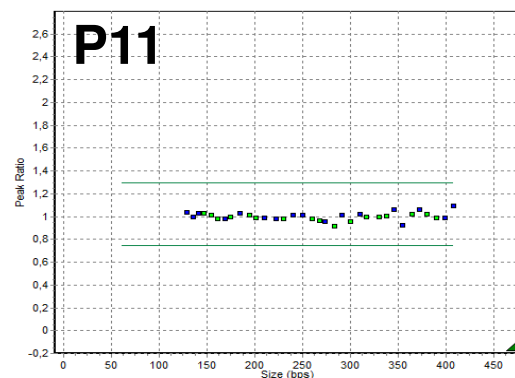
DP do total de sondas	0,035
DP de sondas de controles negativos	0,034
DP de sondas de controle interno	0,038
DP de sondas de amostra teste	0,034



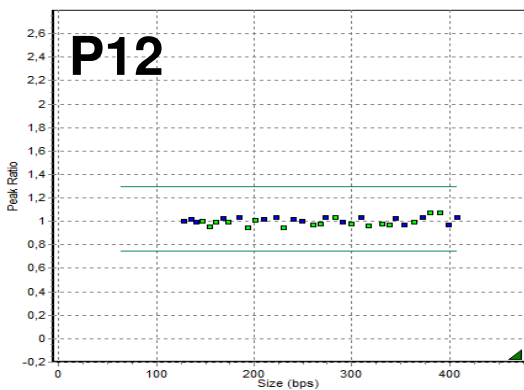
Parâmetros de normalização	
DP do total de sondas	0,041
DP de sondas de controles negativos	0,043
DP de sondas de controle interno	0,040
DP de sondas de amostra teste	0,043



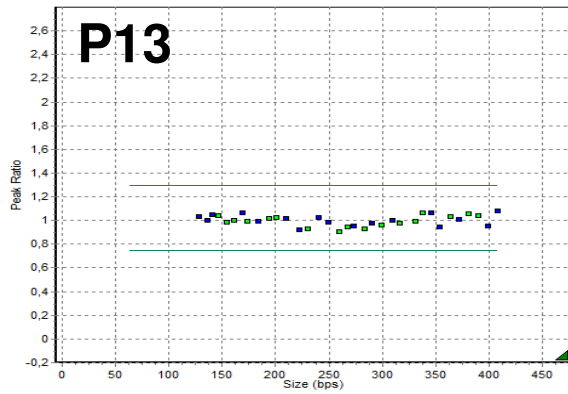
Parâmetros de normalização	
DP do total de sondas	0,043
DP de sondas de controles negativos	0,043
DP de sondas de controle interno	0,043
DP de sondas de amostra teste	0,043



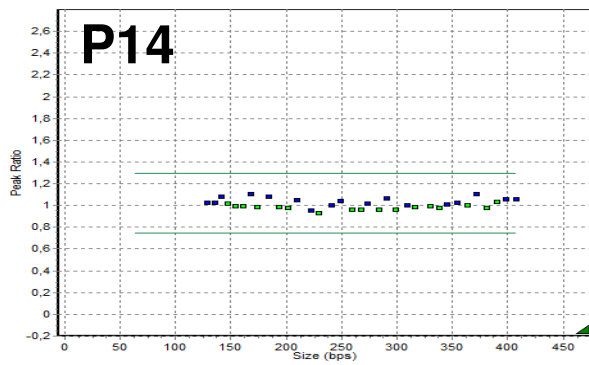
Parâmetros de normalização	
DP do total de sondas	0,036
DP de sondas de controles negativos	0,027
DP de sondas de controle interno	0,044
DP de sondas de amostra teste	0,027



Parâmetros de normalização	
DP do total de sondas	0,031
DP de sondas de controles negativos	0,025
DP de sondas de controle interno	0,034
DP de sondas de amostra teste	0,025



Parâmetros de normalização	
DP do total de sondas	0,047
DP de sondas de controles negativos	0,049
DP de sondas de controle interno	0,046
DP de sondas de amostra teste	0,049



Parâmetros de normalização	
DP do total de sondas	0,044
DP de sondas de controles negativos	0,023
DP de sondas de controle interno	0,040
DP de sondas de amostra teste	0,023