



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**ANÁLISE DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS NO ADENOCARCINOMA  
GÁSTRICO**

Paula Baraúna de Assumpção

BELÉM-PA

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**ANÁLISE DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS NO ADENOCARCINOMA  
GÁSTRICO**

Autora: Paula Baraúna de Assumpção

Orientador: Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos  
Santos

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Genética e Biologia Molecular, do Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal do  
Pará, como requisito para obtenção do grau de  
Doutor em Genética e Biologia Molecular.

BELÉM-PA

2022

# **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FONTES FINANCIADORAS**

## **Instituições Participantes:**

- Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM) - Instituto de Ciências Biológicas (ICB)/Universidade Federal do Pará (UFPA).
- Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUIBB-UFPA)
- Núcleo de Pesquisas em Oncologia (NPO-UFPA)
- Laboratório de Biologia Molecular - Hospital Ophir Loyola

## **Instituições Financiadoras**

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)- apoio financeiro à pesquisa.
- Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES) – bolsa concedida.
- Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisa- Nº do ICCAF: 002/2021.

Paula Baraúna de Assumpção

**ANÁLISE DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS NO ADENOCARCINOMA  
GÁSTRICO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Genética e Biologia Molecular.

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos

Instituição: Universidade Federal do Pará

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Paulo Kassab

Instituição: Santa Casa de São Paulo

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Geraldo Ishak

Instituição: Universidade Federal do Pará

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. João Farias Guerreiro

Instituição: Universidade Federal do Pará

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Rommel Mário Rodrigues Burbano (Suplente)

Instituição: Universidade Federal do Pará

Assinatura: \_\_\_\_\_

BELÉM-PA

2022

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho ao meu querido pai,  
Paulo Assumpção, pela paciência, amor,  
dedicação e motivação em todas as etapas da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus em primeiro lugar.

Aos meus pais, Paulo e Mônica, que representam o alicerce da minha vida, companheiros e incentivadores, fontes inesgotáveis de inspiração pessoal, profissional e acadêmica. Eles que estiveram ao meu lado em todos os momentos, enfrentaram comigo os maiores desafios e mais árduas conquistas, sempre zelando por mim. Meu ponto de equilíbrio, a quem dedico amor incondicional e eterna gratidão.

Aos meus filhos, Henrique e Amora, minha motivação diária para alcançar o melhor de mim.

Ao meu esposo, João Felipe, pela cumplicidade, cuidado, por tornar a caminhada mais leve.

Aos meus irmãos e toda a minha família, pelo apoio, compreensão e incentivo constantes.

Ao meu orientador, Dr. Sidney Santos, pelas oportunidades, por sempre me incentivar a aumentar meus horizontes acadêmicos por meio de sua orientação e inesgotável paciência. Minha eterna gratidão ao seu profissionalismo, dedicação e compreensão nos momentos difíceis.

Ao professor Dr. Jorge Estefano Santana de Souza e professor Dr. Fabiano Cordeiro Moreira, pelo fundamental apoio nas análises de bioinformática.

À todos os integrantes do Núcleo de Pesquisa em Oncologia, do Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará e do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Ophir Loyola, que tornaram possível o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

## RESUMO

O adenocarcinoma gástrico permanece como grave problema de saúde pública mundial e, especialmente, na região norte do Brasil apresenta incidência e mortalidade elevadas. A maioria dos diagnósticos ocorre em fase avançada da doença, comprometendo os resultados terapêuticos. A identificação de indivíduos sob maior risco para esta neoplasia poderia proporcionar o desenvolvimento de estratégias de rastreamento, favorecendo diagnósticos mais precoces e desfechos clínicos menos graves. Dentre as situações clínicas cujo risco é sabidamente superior destacam-se as famílias com câncer gástrico hereditário. Entretanto, a frequência de diagnósticos de cânceres gástricos hereditários é pequena, e há poucos marcadores moleculares reconhecidos nestas síndromes, não obstante haver significativo número de pacientes diagnosticados em idades inferiores às usuais e/ou com múltiplos casos familiares, nos quais não é possível estabelecer um diagnóstico molecular de adenocarcinoma gástrico hereditário. Objetivando explorar a ocorrência de mutações germinativas potencialmente relacionadas ao risco de adenocarcinoma gástrico em pacientes jovens, 95 indivíduos diagnosticados com esta neoplasia até a idade de 50 anos, foram submetidos a sequenciamento completo de exoma séricos, em plataforma NGS. Foram calculados o número total de mutações germinativas e em subsets de genes específicos, sabidamente relevantes para câncer, e comparados com indivíduos sem câncer, grupo composto por ameríndios. Nenhuma das mutações classicamente descritas como causais ocorreu nos pacientes investigados. Entretanto, foram encontradas diversas mutações germinativas potencialmente relacionadas ao risco aumentado, que atualmente não são relacionadas à carcinogênese e requerem validações complementares. O número total de mutações germinativas (GMB) foi superior no grupo de portadores de câncer gástrico, com significado estatístico, podendo, caso validado em outras séries, se tornar um potencial teste minimamente invasivo para identificar indivíduos com risco aumentado para câncer gástrico. Adicionalmente os subsets GHFI (mutações germinativas de alto impacto funcional), GMEd (mutações germinativas de alto impacto funcional em genes com descrição clínica de doenças em geral), Ghallmark (mutações germinativas de alto impacto funcional em genes descritos com hallmarks) também apresentaram diferenças estatísticas significativas, com números superiores no grupo câncer quando comparado ao grupo sem câncer. Em relação ao subset GRepRep (mutações germinativas de alto impacto funcional em genes de replicação e reparo), não obstante o grupo câncer ter número de mutações superior ao grupo não câncer, o pequeno número de mutações encontradas em ambos os grupos

possivelmente contribuiu para que não fosse alcançado impacto estatístico. A via classicamente relacionada ao câncer hereditário (CDH1), quando investigada pelo subset de genes específicos (GCDH1path), demonstrou pequeno número de mutações em ambos os grupos, e nenhuma mutação reconhecidamente patogênica, fortalecendo a hipótese de que outras alterações germinativas estão envolvidas na gênese do câncer gástrico hereditário.

**Palavras-chave:** Adenocarcinoma Gástrico Hereditário; NGS; Mutações germinativas.

## ABSTRACT

Gastric adenocarcinoma remains a serious public health problem worldwide and, especially, in the northern region of Brazil, it has a high incidence and mortality. Most diagnoses occur at an advanced stage of the disease compromising therapeutic results. The identification of the individuals at higher risk for this neoplasm could provide the development of screening strategies, favoring earlier diagnoses and less severe clinical outcomes. Among the clinical situations whose risk is known to be higher, families with hereditary gastric cancer stand out. However, the frequency of diagnoses of hereditary gastric cancers is scarce, and there are few recognized molecular markers in these syndromes, despite a significant number of patients diagnosed at younger ages and/or with multiple familial cases, in with it is not possible to establish a molecular diagnosis of hereditary gastric adenocarcinoma. Aiming to explore the occurrence of germline mutations potentially related to higher risk of gastric adenocarcinoma in young patients, 95 individuals diagnosed with this neoplasm up to the age of 50 years, were submitted to complete sequencing of serum exome, in an NGS platform. The total number of germline mutations and germline mutation in subsets of specific genes, known to be relevant for cancer, were calculated and compared with individuals without cancer, a group composed of Ameridians. None of the classical described as causal mutations occurred in the investigated patients. However, several germline mutations potentially related to increased risk were found, which are currently not related to carcinogenesis and require further validation. The total number of germline mutations (GMB) was superior in the group of gastric cancer patients, with statistical significance, which, if validated in other series, could become a potential minimally invasive test to identify individuals at increased risk for gastric cancer. Additionally, the subsets GHFI (high functional impact germline mutations), GMed (high functional impact germline mutations among genes related to clinical diseases), GHallmark (high functional impact germline mutations in cancer's hallmarks genes), also showed statistical significance, with higher numbers in the cancer group when compared to the non-cancer group. Regarding the GRepRep subset (high functional impact germline mutations in genes involved in the replication or repair process), despite the cancer group having a higher number of mutation then the non-cancer group, the small number of mutations found in both groups possibly contributed to the lack of statistical impact. The classically related hereditary cancer pathway (CDH1), when investigated by the specific genes subset (GCDH1path), showed few mutations in both groups, and no known pathogenic mutations, strengthening the hypothesis that other germline alterations are involved in the genesis of hereditary gastric cancer.

**Keywords:** Hereditary gastric adenocarcinoma; NGS; Germline mutations.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma, em todo o Brasil.	16
<b>Figura 2</b> - Representação espacial das taxas ajustadas de incidência de neoplasia maligna do estômago por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2023.	17
<b>Figura 3</b> - Representação espacial das taxas ajustadas de incidência de neoplasia maligna do estômago por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2023.	18
<b>Figura 4</b> - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma. Dados referentes à região Norte.	19
<b>Figura 5</b> - Incidência de CG por tipo histológico de acordo com sexo, em adultos com idade $\geq 20$ anos, em três cidades brasileiras: Belém (1996-210), Fortaleza (1990- 2006) e São Paulo (1997-2012). *(A) Adenocarcinoma; (I) Intestinal, (D) Difuso.	20
<b>Figura 6</b> - Incidência e mortalidade global por CG ao longo dos anos.	20
<b>Figura 7</b> - Influência de fatores de risco em diversos tipos de câncer	21
<b>Figura 8</b> - Subtipos de câncer Gástrico: distribuição de subtipos de acordo com as características moleculares	24
<b>Figura 9</b> - Recomendações para a prática clínica no adenocarcinoma gástrico.	27
<b>Figura 10</b> - Representação esquemática da molécula de E-caderina.	34

## LISTA DE QUADROS

	Página
<b>Quadro 01</b> - Síndromes hereditárias de câncer gástrico e outras síndromes hereditárias associadas ao câncer gástrico.	29
<b>Quadro 2</b> - Critérios diagnósticos para adenocarcinoma gástrico e polipose proximal do estômago.	31
<b>Quadro 3</b> - Critérios diagnósticos para Câncer Gástrico Familiar Intestinal pelo International Gastric Cancer Linkage Consortium	32
<b>Quadro 4</b> - Critérios para teste genético Câncer Gástrico Difuso Hereditário de acordo com o <i>International Gastric Cancer Linkage Consortium 2020</i>	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADJ.P	<i>Adjusted P-value</i>
AFAP	Polipose Adenomatosa Familiar forma atenuada
AG	Adenocarcinoma Gástrico
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior
CG	Câncer Gástrico
CGDH	Câncer Gástrico Difuso Hereditário
CGFI	Câncer Gástrico Familiar Intestinal
CGH	Câncer Gástrico Hereditário
CIN	Instabilidade cromossômica
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CRC	Carcinoma Colorretal
E-cad	E-caderina
EBV	<i>Vírus Epstein- Barr</i>
EC	Caderina
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
FAP	Polipose Adenomatosa Familiar
FAPESPA	Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisa
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FDR	Parentes de primeiro grau
FIGC	Câncer Gástrico Familiar Intestinal
GAPPS	Adenocarcinoma Gástrico e Polipose Proximal do Estômago
GCDH1path	<i>the number of germline mutations with high functional impact in genes of CDH1 pathway</i>

Ghallmark	<i>The number of non-synonymous mutations in cancer's hallmarks genes</i>
GHFI	<i>The number of non-synonymous mutations presenting high functional impact</i>
GMB	<i>The total number of germline mutations</i>
GMEd	<i>The number of non-synonymous mutations presenting high functional impact among genes related to clinical diseases</i>
GRepRep	<i>The number of non-synonymous mutations in genes involved in the replication or repair processes</i>
GS	<i>Tumores genômicamente estáveis</i>
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
H&E	Hematoxilina-eosina
HGC	<i>Hereditary Gastric Cancer</i>
HGS	<i>High throughput sequencing</i>
HNPPC	Câncer Colorretal Hereditário Sem Polipose
HUJBB	Hospital Universitário João de Barros Barreto
IBP	Inibidores de Bomba de Prótons
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IGC	Câncer Gástrico Intestinal
IGCLC	<i>International Gastric Cancer Linkage Consortium</i>
INCA	O Instituto Nacional do Câncer
LBC	Câncer Lobular de Mama
LGHM	Laboratório de Genética Humana e Médica
LIR	Receptor semelhante à imunoglobulina de leucócitos
MSI	Instabilidade de microssatélite
MSI-H	Instabilidade de microssatélites elevada
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
NPO	Núcleo de Pesquisas em Oncologia

OMS	Organização Mundial de Saúde
SDR	Parentes de segundo grau
SIFT	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TILs	Linfócitos Infiltrantes de Tumor
TMA	Classificação de estadiamento de tumores malignos
TNM	Classificação de estadiamento de tumores malignos
UFPA	Universidade Federal do Pará
UICC	União Internacional para o Controle do Câncer
VUS	<i>Variant of Uncertain Significance</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS E EPIDEMIOLOGIA .....</b>	<b>18</b>
<b>1.2. FATORES DE RISCO .....</b>	<b>23</b>
<b>1.3. CLASSIFICAÇÕES .....</b>	<b>24</b>
<b>1.4. QUADRO CLÍNICO .....</b>	<b>27</b>
<b>1.5. DIAGNÓSTICO TARDIO .....</b>	<b>27</b>
<b>1.6. TRATAMENTO .....</b>	<b>28</b>
<b>1.7. GAPPS .....</b>	<b>32</b>
<b>1.8. CÂNCER GÁSTRICO FAMILIAL INTESTINAL (FIGC) .....</b>	<b>33</b>
<b>1.9. CÂNCER GÁSTRICO DIFUSO HEREDITÁRIO.....</b>	<b>34</b>
<b>1.9.1. CDH1 .....</b>	<b>35</b>
<b>1.9.2. E-CADERINA E “VIAS DE SINALIZAÇÃO” NO CÂNCER.....</b>	<b>37</b>
<b>1.9.3. ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM CDH1.....</b>	<b>39</b>
<b>1.9.4. TESTES GENÉTICOS EM CGDH.....</b>	<b>40</b>
<b>1.9.5. RECOMENDAÇÕES PARA A PRÁTICA CLÍNICA .....</b>	<b>42</b>
<b>1.9.6. DESPROPORÇÃO ENTRE DIAGNÓSTICOS MOLECULARES E DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS .....</b>	<b>46</b>
<b>1.10. EXOMA .....</b>	<b>47</b>
<b>1.11. ALTERAÇÕES GERMINATIVAS NÃO VALORIZADAS PODERIAM CONTRIBUIR PARA CASOS CLÍNICOS DE HGC .....</b>	<b>48</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>50</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>51</b>
<b>4. CAPITULO 1 .....</b>	<b>52</b>

<b>5. CAPITULO 2</b> .....	<b>59</b>
<b>6. CAPITULO 3</b> .....	<b>71</b>
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	<b>94</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>102</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS E EPIDEMIOLOGIA

O câncer é um grupo de doenças que tem como característica comum o crescimento desordenado, agressivo e incontrolável de células. Constitui um dos mais importantes problemas de saúde pública pelos altos índices de casos novos e óbitos, estando entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países.

A OMS estimou, para o ano de 2040, a ocorrência de cerca de 28.4 milhões de novos casos de câncer (SUNG et al., 2021). No Brasil, a estimativa para o ano de 2023 é de 704 mil casos novos de câncer (483 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma) (BRASIL, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2022).

Localização primária	Casos	%		Localização primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%		Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e Reto	21.970	9,2%		Cólon e Reto	23.660	9,7%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.020	7,5%		Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	14.540	6,0%
Cavidade Oral	10.900	4,6%		Glândula Tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%		Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%		Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%		Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%		Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%		Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

\*Números arredondados para múltiplos de 10

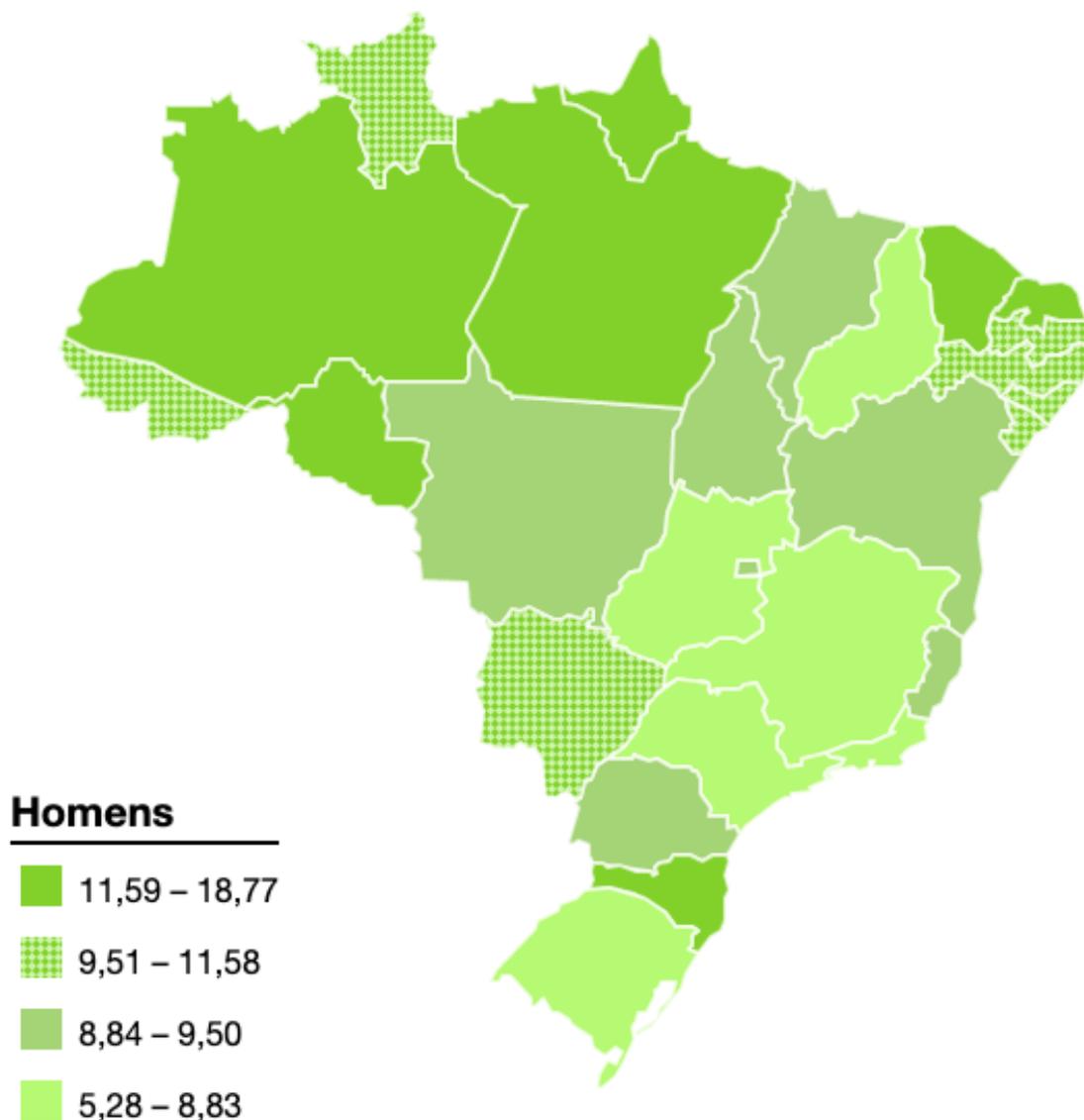
**Figura 1:** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma, em todo o Brasil (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2022).

Dentre os diversos tipos de câncer, destaca-se o câncer gástrico como neoplasia de relevância epidemiológica em nosso país e no mundo, em virtude de altas taxas de incidência e de mortalidade.

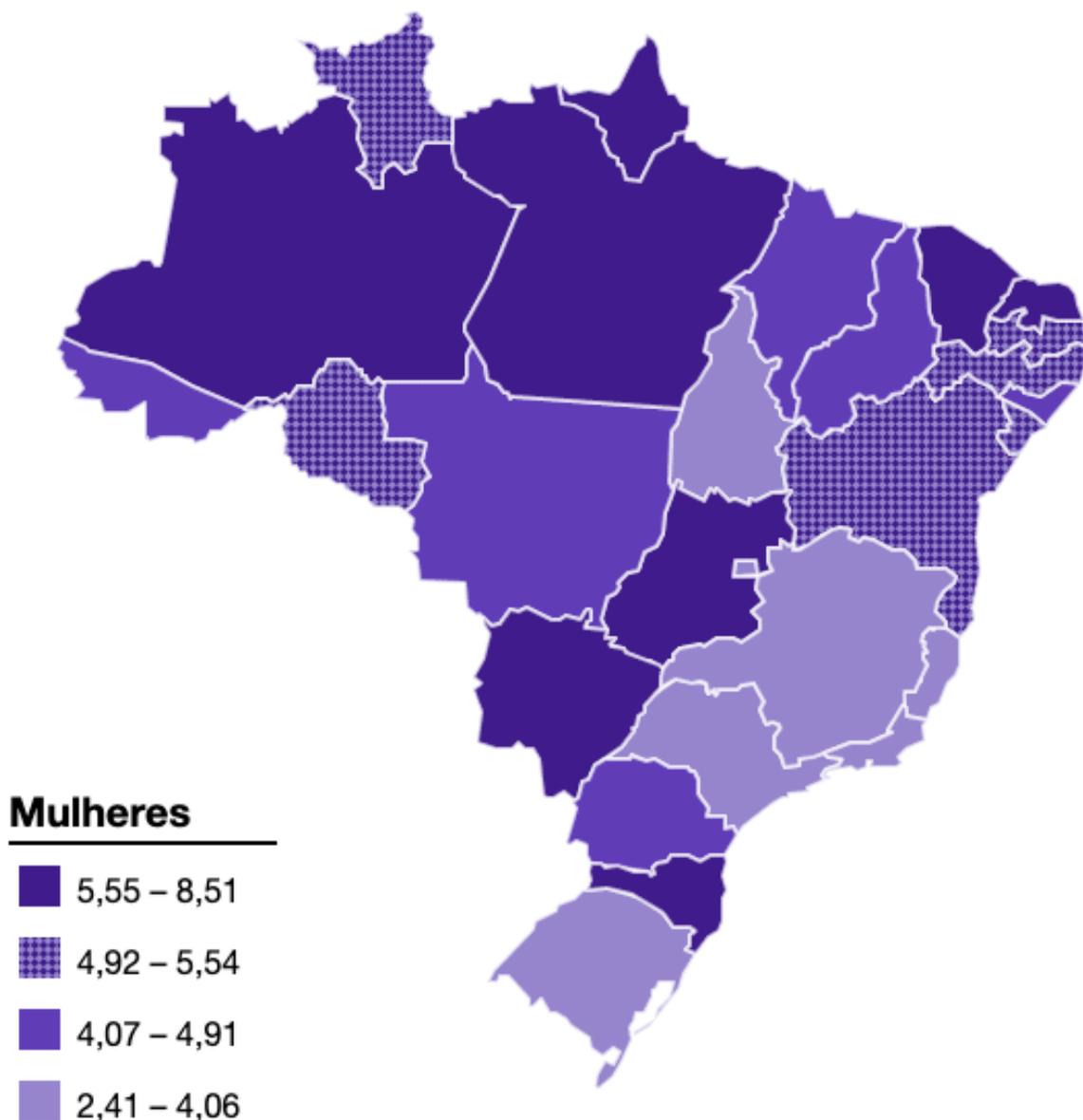
Não obstante, previsões globais de que as taxas de incidência para o câncer de estômago apresentarão decréscimos anuais, da mesma maneira que a mortalidade, como já vem sendo observado nas últimas décadas, estes índices permanecem extremamente elevados, incluindo uma expectativa de sobrevivência de 30% em cinco anos, refletindo o grave problema de saúde pública.

O Globocan estima, para o ano de 2035, a ocorrência de 39.800 novos casos de câncer gástrico no Brasil e de 33.200 óbitos por essa neoplasia. Tais dados alarmam, em especial, pela proximidade entre as taxas de incidência e de mortalidade (TORRE et al., 2015). Para 2023, estima-se 13.340 casos novos de câncer de estômago entre homens e 8.140 entre as mulheres no Brasil. Esses valores correspondem a um risco estimado de 12,63 a cada 100 mil homens e 7,36 para cada 100 mil mulheres brasileiras (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2022).

No território brasileiro existe uma importante diferença epidemiológica regional. O Instituto Nacional do Câncer estima que, na Região Norte, o câncer gástrico represente o quinto tipo de câncer mais prevalente em mulheres e o segundo entre homens, excluindo o câncer de pele não melanoma (CURADO et al., 2019).



**Figura 2:** Representação espacial das taxas ajustadas de incidência de neoplasia maligna do estômago por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2023, segundo Unidade da Federação (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2022).



**Figura 3:** Representação espacial das taxas ajustadas de incidência de neoplasia maligna do estômago por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2023, segundo Unidade da Federação (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2022).

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de estômago em homens é o segundo mais frequente na região Norte (12,55/100 mil), seguido pela região Nordeste (12,17/100 mil) onde ocupa a terceira posição. Nas regiões Sul (15,02/100 mil) e Centro-Oeste (10,20/100 mil) o câncer gástrico é o quarto mais frequente. No Sudeste (12,58/100 mil), ocupa a quinta posição (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2022).

Para as mulheres, ele é o quinto mais frequente nas regiões Sul (8,41/100 mil) e Norte (6,53/100 mil). Nas demais regiões, Centro-Oeste (6,68/100 mil) e Nordeste (7,46/100 mil),

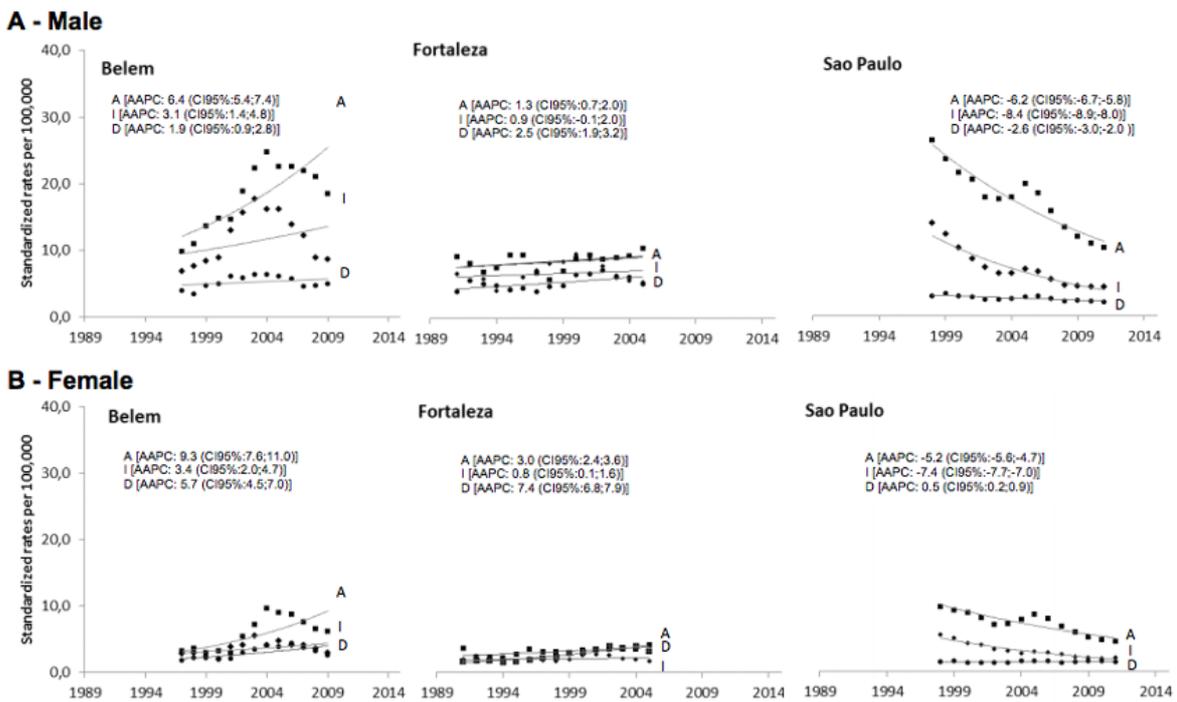
ocupa a sexta posição, seguido pela Região Sudeste (7,25/100 mil) que esta neoplasia ocupa a oitava posição (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2022).

O Estado do Pará historicamente apresenta taxas de mortalidade superiores à média brasileira. Entretanto, os dados oficiais podem estar subestimados o que minimizaria a magnitude do problema, no Estado (GUIMARÃES; MUZI, 2012).

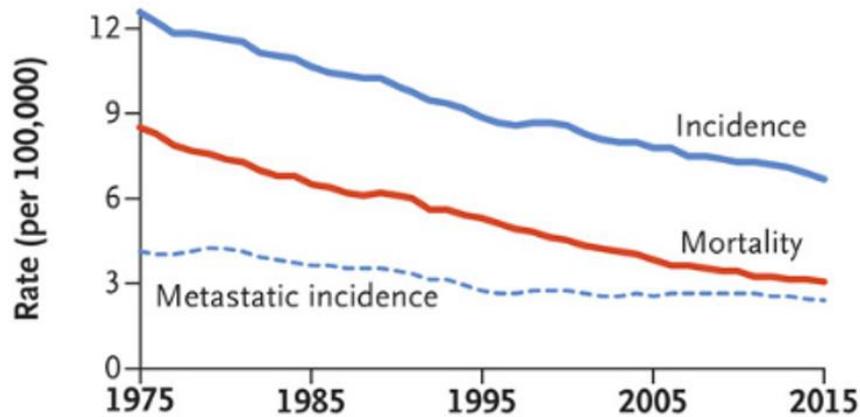
Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	2.760	26,5%			Mama feminina	2.410	22,4%
Estômago	1.200	11,5%	Homens	Mulheres	Colo do útero	1.980	18,4%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	880	8,5%			Cólon e Reto	740	6,9%
Cólon e Reto	690	6,6%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	650	6,0%
Cavidade Oral	440	4,2%			Estômago	630	5,9%
Leucemias	440	4,2%			Leucemias	350	3,3%
Fígado	430	4,1%			Ovário	340	3,2%
Sistema Nervoso Central	320	3,1%			Fígado	320	3,0%
Esôfago	270	2,6%			Glândula Tireoide	320	3,0%
Laringe	260	2,5%			Sistema Nervoso Central	270	2,5%

**Figura 4:** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma. Dados referentes à região Norte (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2022).

Publicação recente avaliando incidência e mortalidade por câncer gástrico em três capitais brasileiras destaca a gravidade dos índices em Belém, cujo padrão de comportamento epidemiológico difere das demais capitais (figura 5) (CURADO et al., 2019), e, igualmente, difere do que se observa globalmente (figura 6), persistindo com tendências de elevação de incidência e mortalidade (WELCH *et al.*, 2019).



**Figura 5:** Incidência de CG por tipo histológico de acordo com sexo, em adultos com idade  $\geq 20$  anos, em três cidades brasileiras: Belém (1996-210), Fortaleza (1990- 2006) e São Paulo (1997-2012). \*(A) Adenocarcinoma; (I) Intestinal, (D) Difuso.(CURADO *et al.*, 2019).



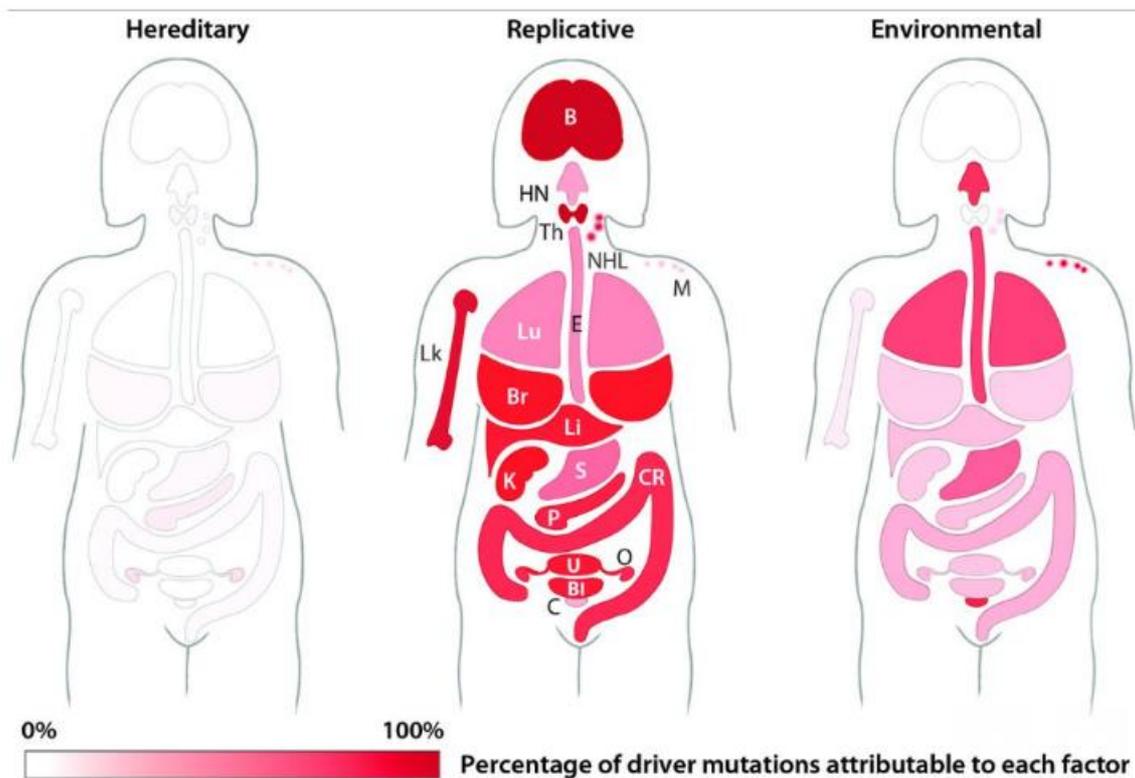
**Figura 6:** Incidência e mortalidade global por CG ao longo dos anos (WELCH *et al.*, 2019- adaptado).

Os dados epidemiológicos apresentados reforçam a importância da realização de investigações científicas relacionadas ao câncer gástrico no Estado do Pará.

## 1.2 FATORES DE RISCO

Atualmente, para todos os tipos de neoplasia malignas humanas admitem-se três grupos de causas de mutações “driver”, com capacidade de favorecer o desenvolvimento de cânceres: hereditárias (H); ambientais (E); e decorrentes de erros de replicação em células troncos (R) (TOMASETTI; VOGELSTEIN, 2015).

Para o câncer gástrico, a distribuição das referidas causas demonstra o predomínio das causas ambientais (55,3%), seguido pelas decorrentes dos erros aleatórios de replicação em células tronco (43,2%) e, em menor número, por fatores hereditários (1,5%), constituídas pelas síndromes hereditárias que acarretam elevado risco para a ocorrência do adenocarcinoma gástrico (TOMASETTI *et al.*, 2017).



**Figura 7:** Influência de fatores de risco em diversos tipos de câncer (TOMASETTI *et al.*, 2017).

A associação entre estas causas ocorre usualmente<sup>6</sup> e assim, considera-se que o câncer gástrico é uma neoplasia multifatorial envolvendo risco genéticos e ambientais. Destaca-se a infecção por *Helicobacter pylori* como principal fator de risco ambiental para o desenvolvimento de CG. Outros fatores, como o consumo de alimentos conservados em sal e defumados, também merecem destaque. Acrescentam-se, ainda, tabagismo, obesidade,

infecção pelo vírus Epstein- Barr (EBV), e exposição ocupacional a determinadas substâncias como carvão e ferro, dentre os fatores ambientais (TOMASETTI; VOGELSTEIN, 2015).

Apesar de os tumores gástricos serem na maioria das vezes esporádicos, existem síndromes hereditárias que podem predispor ao seu desenvolvimento. Dentre elas, destaca-se a Síndrome de Câncer Gástrico Difuso Hereditário, por conferir um risco muito elevado ao desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico. Tal síndrome caracteriza-se por mutação em CDH1, gene que codifica a E-Caderina, exibindo um padrão de hereditariedade autossômico dominante de penetrância incompleta. A gastrectomia total profilática pode ser indicada tendo em vista uma incidência de adenocarcinoma gástrico maior que 70% em familiares portadores da mutação. Citam-se, ainda, Adenocarcinoma Gástrico e Polipose Proximal do Estômago (GAPPS) e Câncer Gástrico Familiar Intestinal (CGFI), além de outras síndromes de câncer hereditário associadas a aumento de risco para câncer gástrico, como Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e a síndrome de Lynch. As síndromes de CG hereditário serão discutidas em tópicos específicos deste documento.

Diversas alterações genéticas estão associadas ao desenvolvimento de câncer gástrico, especialmente em genes que codificam fatores de crescimento, reguladores do ciclo celular, moléculas de adesão e enzimas que atuam na matriz celular, dentre outras. Além disso, fatores epigenéticos também contribuem para a carcinogênese. As mutações do gene P53 são amplamente descritas por serem as mais frequentemente encontradas nos portadores desta neoplasia.

### **1.3 CLASSIFICAÇÕES**

O câncer gástrico pode se desenvolver em qualquer região anatômica do estômago (cárdia, fundo, corpo e antro). Porém, os tumores que acometem a cárdia diferem das lesões gástricas distais em diversos aspectos, incluindo epidemiológicos, clínicos, genéticos, e prognósticos, e dessa forma, recentemente, passaram a ser consideradas neoplasias do esôfago (WASHINGTON, 2010) e, portanto, não serão abordados neste texto.

Cerca de 95% dos casos de câncer gástrico correspondem a adenocarcinomas. Em função dessa prevalência, ao longo do texto, a citação de adenocarcinoma gástrico referir-se-á, exclusivamente, ao adenocarcinoma, não obstante ocorrerem, também, outros tipos de neoplasias gástricas como: linfomas, sarcomas, tumores do estroma gastrintestinal, carcinoides, tumores adenoescamosos e espinocelulares.(YAKIREVICH; RESNICK, 2013)

É possível classificar o câncer gástrico em diversos aspectos. Uma das classificações mais difundidas é a histológica de Lauren, que divide os adenocarcinomas gástricos nos tipos intestinal e difuso.

O tipo intestinal exibe um padrão de crescimento expansivo, células com núcleos grandes e irregulares e uma coesão celular que favorece a formação de estruturas tubulares do tipo glandular. Por outro lado, o tipo difuso é constituído de pequenas células não coesas, difusamente dispersas, que não formam estruturas glandulares, podendo apresentar células com núcleos periféricos (anel de sinete) devido à elevada produção de mucina (CORREA, 2013).

O tipo intestinal geralmente é precedido de lesões pré-neoplásicas progressivas, que ocorrem após a gastrite superficial ou não-atrótica, incluindo gastrite atrótica multifocal, metaplasia intestinal do tipo completo, metaplasia intestinal do tipo incompleto, displasia de baixo grau e displasia de alto grau. Esta sequência de transformações foi descrita por Pelayo Correa em 1988 e se tornou conhecida como Cascata de Correa (CORREA, 1995).

O adenocarcinoma do tipo difuso poderia evoluir a partir da mucosa normal diretamente para o câncer e ocasionar metástases precocemente e estaria associado a fatores genéticos. Esta variante histológica apresenta taxa mitótica menor em relação aos tumores intestinais e é mais comum em populações submetidas a um baixo risco ambiental (CORREA, 1995).

O tipo intestinal é mais frequente em homens, sobretudo em faixas etárias mais avançadas. Por outro lado, o tipo difuso apresenta taxas de incidências similares entre os gêneros.

Não obstante adenocarcinomas gástricos intestinais e difusos serem usualmente considerados com entidade única, há consideráveis diferenças em seus fatores de risco, carcinogênese, abordagens terapêuticas e prognósticos (WASHINGTON, 2010).

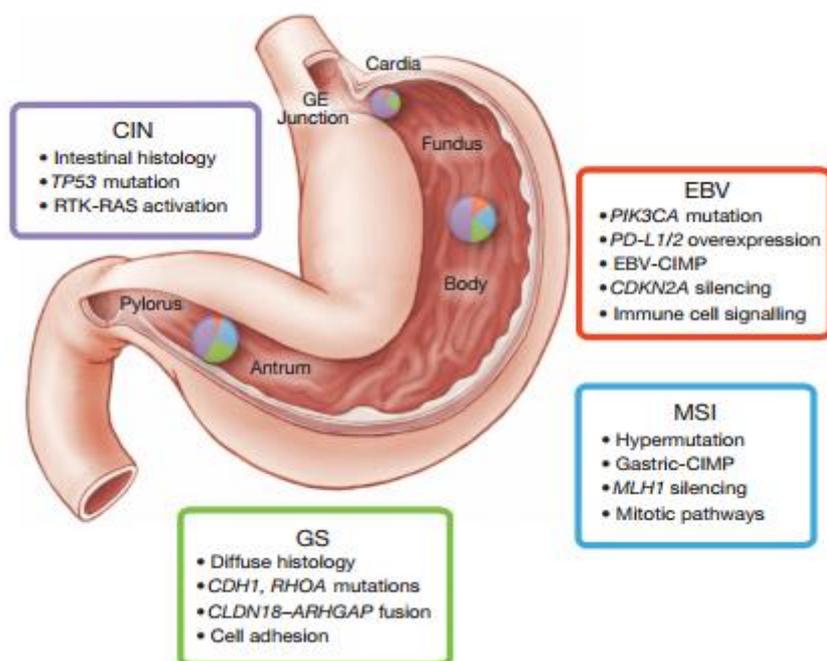
Semelhante ao que ocorre com outras neoplasias, o adenocarcinoma gástrico é estadiado pelo sistema TNM, determinando: extensão do tumor primário (T), ausência ou presença de metástases para linfonodos regionais e número de linfonodos acometidos (N) e ausência ou presença de metástases à distância (M). A combinação de T, N e M em grupos específicos irá designar a extensão anatômica do câncer e relacionar-se-á com o prognóstico (DEKKER; ORTH, 1977; KIM et al., 2011).

O CG ainda pode ser classificado como precoce, quando está restrito a mucosa e submucosa, independentemente da sua extensão em superfície, e da presença ou não de metástases ganglionares. Esse tipo de adenocarcinoma possui um bom prognóstico. O tumor é considerado avançado quando atingir as camadas posteriores à submucosa podendo ou não

apresentar metástase nos linfonodos e órgãos como o pulmão, glândulas adrenais, fígado, osso e cavidade peritoneal (KIM et al., 2011; MACDONALD, 1992).

Uma nova classificação molecular para o câncer gástrico foi proposta por um grupo de pesquisadores do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), dividindo o adenocarcinoma em 4 tipos: 1- CIN, grupo de instabilidade cromossômica, caracterizado por histologia intestinal, aneuploidia, mutações de TP53 e ativação de RTK-RAS; 2- positivo para EBV, que apresenta mutação PIK3CA frequente, amplificação de PD-L1/2, hipermetilação do DNA intensa, silenciamento de CDKN2A e sinalização de células imunológicas; 3- Instabilidade de microssatélite, caracterizado por altas taxas de mutações, CIMP gástrico (metilação de ilhas CpG), silenciamento de MLH1 e vias de mitose; 4- Tumores genomicamente estáveis, caracterizado por histologia do tipo difuso, mutações CDH1 e RHOA, fusão de CLDN18-ARHGAP e perda de adesão celular (NETWORK, 2014).

Esta classificação pretende favorecer o entendimento sobre características moleculares que influenciam o manejo clínico, permitindo escolhas terapêuticas adequadas aos perfis moleculares de cada tumor.



**Figura 8:** Subtipos de câncer Gástrico: distribuição de subtipos de acordo com as características moleculares (*The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014*).

## **1.4 QUADRO CLÍNICO**

O câncer gástrico é inicialmente assintomático ou provoca sintomas inespecíficos, como desconforto epigástrico e dor abdominal não incapacitante, de modo que os portadores demoram a procurar assistência médica e, quando o fazem, recebem, frequentemente, tratamento para doenças benignas enquanto o tumor se desenvolve. Pode haver disfagia, anorexia, perda ponderal não justificada, vômitos, anemia ferropriva, entre outras manifestações inespecíficas (MINCIS, 2013; CORREA, 2013).

Conforme a doença progride, se desenvolvem sinais relacionados à doença avançada ou metastática, como massa abdominal palpável, linfonodo de Virchow, prateleira de Blumer, tumor de Krukenberg, ascite, icterícia e caquexia. Os principais sítios de metástase à distância são o fígado e o peritônio e ocorrem tanto por via hematogênica como celômica e linfáticas. Fenômenos paraneoplásicos raros como anemia hemolítica microangiopática e poliarterite nodosa podem se desenvolver.

## **1.5 DIAGNÓSTICO TARDIO**

Como consequência de um quadro clínico incipiente inespecífico, e ausência de métodos custo-eficazes de rastreamento, o diagnóstico é feito, na maioria das vezes, em estádios avançados com prognóstico desfavorável. Deste modo, justifica-se a crescente busca por marcadores que permitam identificar indivíduos com risco aumentado para o desenvolvimento desta neoplasia, objetivando proporcionar um diagnóstico precoce e oferecer uma terapêutica com maiores índices de eficácia.

O método diagnóstico de escolha é a endoscopia digestiva alta, que permite a identificação macroscópica, localização e delimitação de lesões suspeitas, obtenção de imagens da lesão, avaliação gástrica detalhada, incluindo ainda a mucosa adjacente e possíveis lesões sincrônicas. Adicionalmente, propicia a obtenção de amostra para análise histopatológica por meio de biópsia, constituindo o padrão ouro para o diagnóstico do adenocarcinoma gástrico (MACHLOWSKA et al., 2020).

O diagnóstico em estádios iniciais proporciona melhores índices de sobrevida e possibilita escolhas terapêuticas minimamente invasivas como as ressecções endoscópicas. Por outro lado, doenças diagnosticadas em estádios muito avançados não se beneficiam do

tratamento cirúrgico e possuem índices de sobrevida extremamente baixos (EUSEBI et al., 2020).

## 1.6 TRATAMENTO

O tratamento cirúrgico constitui o padrão ouro, incluindo a gastrectomia e linfadenectomia do tipo D2. O procedimento cirúrgico ideal para cada paciente deve ser adequado à localização e extensão do tumor, incluindo ressecções totais ou subtotais (SMYTH et al., 2016).

Admite-se, em casos iniciais, as ressecções endoscópicas, mucosectomias e disseções submucosas, com finalidade curativa. Entretanto, o número de diagnósticos em fases iniciais que permitem esta consideração terapêutica é extremamente menor, do que daqueles com doença avançada. Ressalta-se que as chances de cura em casos iniciais, sejam tratados endoscopicamente ou cirurgicamente, são muito elevadas, em oposição aos casos avançados, poucas vezes curáveis (BARCHI et al., 2020).

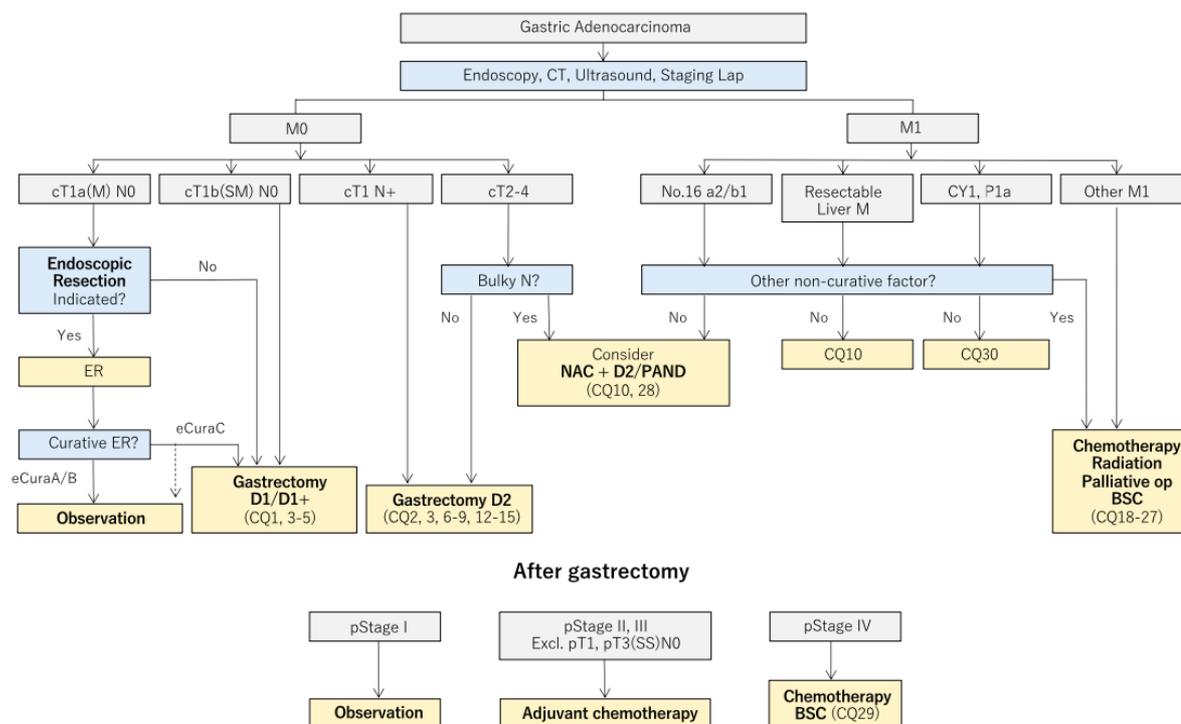
Recentemente, cirurgias por videolaparoscopia foram incorporadas no arsenal terapêutico de tumores distais não avançados.

Adicionalmente ao tratamento cirúrgico, em casos de doença avançada, associam-se, usualmente, outras modalidades terapêuticas em regimes adjuvantes, ou pré-operatórios. São elas a quimioterapia, radioterapia e terapia alvo com anticorpos anti-HER2 e anti-EGFR e a imunoterapia baseada nos marcadores PD1 e PDL-1 que surgiu como um potencial avanço na abordagem do câncer gástrico (WAGNER et al., 2010; HAMANISHI et al., 2016).

Recentemente, demonstrou-se que tumores com instabilidade de microssatélites elevada (MSI-H), não se beneficiam de quimioterapia, mesmo quando avançados, reservando-se para estes casos cirurgia isoladamente, ou associada à imunoterapia.

Em caso de doença metastática, o tratamento paliativo preferencial é a quimioterapia sistêmica, e, quando indicado, a imunoterapia, reservando-se a cirurgia para complicações do tipo perfuração, obstrução e sangramentos não controlados por outras medidas (KIM et al., 2011b).

As recomendações propostas pela *International Gastric Cancer Association* estão resumidas na figura 9.



**Figura 9:** Recomendações para a prática clínica no adenocarcinoma gástrico. Fonte: Japanese gastric cancer treatment guidelines 2021 (6th edition). (ASSOCIATION, 2022).

Muitas das mais importantes inovações promovidas pela ciência da luta contra o câncer concentram-se em tratamentos de alto custo, como terapias alvo, e são, frequentemente, direcionadas a tumores avançados. Não obstante os benefícios decorrentes dessas estratégias, o alto custo de seu emprego limita intensamente o acesso pela população, e supera a capacidade de financiamento público e privado (PATEL; CECCHINI, 2020).

O número de pacientes efetivamente beneficiados pelos referidos avanços é largamente superado pelos casos novos, diagnósticos em fase avançada, e doentes para os quais não se pode oferecer tratamentos que objetivem controlar a doença.

Em consequência, o desequilíbrio entre a crescente magnitude do problema câncer e a capacidade da ciência e governo o controlarem, expande-se intensamente, delineando um cenário de insustentabilidade.

Estratégias que vislumbrem o controle do câncer devem necessariamente ser direcionadas à prevenção e a busca de identificação precoce da doença, favorecendo o melhor

resultado terapêutico, e proporcionando redução de morbidade e mortalidade relacionadas à doença (EUSEBI et al., 2020).

Iniciativas que objetivam identificar indivíduos sob maior risco de ocorrência de câncer gástrico, e permitir o desenho de protocolos de rastreamento e prevenção, terão potencial impacto na ocorrência do câncer, e no sucesso de intervenções favorecidas por diagnósticos precoces.

Dentre os indivíduos sob risco aumentado para o desenvolvimento de câncer gástrico, destacam-se aqueles com padrões alimentares associados à incidência aumentada destes tumores; portadores de lesões ditas pré-neoplásicas como atrofia gástrica, metaplasia intestinal e displasia gástrica; e infectados pelo *H. pylori*. (POOROLAJAL et al., 2020). Entretanto, familiares de pacientes portadores de AG, em especial daqueles acometidos em idades menos avançadas, representam grupo de risco frequentemente subvalorizados na prática clínica.

Pacientes com câncer gástrico hereditários são raramente diagnosticados. Atribui-se a fatores hereditários aproximadamente 10% dos AG, entretanto o diagnóstico formal de AG hereditário é obtido em apenas 1%-3% dos casos (POST et al., 2019).

Não obstante merecerem tratamentos semelhantes aos casos esporádicos, ressalvadas algumas peculiaridades, o diagnóstico de CGH representa uma oportunidade para o estabelecimento de medidas dirigidas aos familiares, que podem resultar em prevenção do câncer, ou ainda, em diagnósticos de tumores assintomáticos, em fases menos avançadas, beneficiando-os com elevados índices de curabilidade (MASTORAKI et al., 2011).

Destaca-se a existência de diversas medidas formalmente elencadas dirigidas aos familiares de portadores de cada uma das síndromes de CGH, que serão discutidas a seguir.

O CGH apresenta-se em três síndromes principais: Câncer Gástrico Difuso Hereditário (CGDH), Adenocarcinoma e Polipose Proximal do Estômago (GAPPS) e Câncer Gástrico Familiar Intestinal (FIGC), além de outras síndromes de câncer hereditário, como PeutzJeghers, Li Fraumeni e Lynch, conforme listado no quadro 01 (COLVIN et al., 2015).

Em especial, discutiremos, com maior profundidade, o CGDH, objeto da investigação proposta, e a mais frequente destas síndromes.

**Quadro 1.** Síndromes hereditárias de câncer gástrico e outras síndromes hereditárias associadas ao câncer gástrico.

Síndrome	Principal característica	Mutação associada
<b>Síndromes de câncer gástrico hereditário</b>		
Câncer gástrico difuso hereditário	Herança autossômica dominante. CG do tipo difuso, com alta penetrância e início precoce da doença agressiva em casos decorrentes de mutações patogênicas de CDH1.	CDH1 CTNNA1
Câncer gástrico familiar intestinal	Herança autossômica dominante. CG do tipo intestinal sem polipose gástrica associada.	Desconhecido
Adenocarcinoma gástrico e polipose proximal do estômago	Herança autossômica dominante. CG do tipo intestinal com polipose de glândulas fúndicas do estômago proximal.	Desconhecido
<b>Outras síndromes de câncer hereditário que podem dar origem ao CG</b>		
Polipose adenomatosa familiar	de início precoce, com penetrância quase completa. CG pouco comum (<2%).	APC
Síndrome de câncer de mama e ovário hereditários	Herança autossômica dominante. Câncer de mama e ovário. CG pouco comum (1,7%).	BRCA1 BRCA2
Síndrome de polipose juvenil	Herança autossômica dominante. Polipose do trato gastrointestinal e câncer colorretal. CG infrequente.	SMAD4 BMPR1A
Síndrome de Li-Fraumeni	Herança autossômica dominante que causa uma variedade de cânceres: mama, cérebro, adrenais e sarcomas. O CG é de início precoce (4,9%).	p53
Síndrome de Lynch	Herança autossômica dominante. Alta penetrância de câncer colorretal de início precoce. O CG, predominantemente do tipo intestinal, é pouco frequente (1,6%).	Mutações em genes de reparo
Síndrome de Peutz-Jeghers	Herança autossômica dominante. Pólipos hamartomasos com pigmentação mucocutânea no trato gastrointestinal. CG infrequente.	STK11

Fonte: COLVIN et al., 2015 – Adaptado

## 1.7 GAPPS

GAPPS é uma síndrome de polipose gástrica rara, recentemente descrita. Possui um padrão de herança autossômico dominante com penetrância incompleta, com predisposição significativa para adenocarcinoma gástrico, metástase e morte. É caracterizada por uma grande concentração de pólipos de glândulas fúndicas envolvendo o corpo e o fundo do estômago, poupando o antro, pequena curvatura e o duodeno. Esses pólipos podem estar associados a lesões displásicas e câncer gástrico do tipo intestinal (RUDLOFF, 2018).

O GAPPS foi incluído recentemente aos distúrbios associados à APC, como Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e a forma atenuada (AFAP), causada pela perda desse supressor de tumor. Sua etiologia foi associada a mutações no promotor IB do gene APC (c.-191T> C, c.-192A> G e c.-195A> C), que reduzem a ligação do fator de transcrição Yin Yang 1 (YY1) e a atividade transcricional do promotor (MITSUI et al., 2018). Trata-se de nova síndrome, sendo, portanto, possível que outras alterações moleculares, ainda não publicadas, também gerem o fenótipo, em casos nos quais as reconhecidas mutações no promotor do APC não estejam presentes.

O diagnóstico é feito pelos seguintes fatores: um padrão de herança autossômica dominante; presença de pólipos de glândulas fúndicas poupando o antro e a pequena curvatura do estômago; ausência de polipose colônica e duodenal; exclusão de outras síndromes de polipose gástrica e o uso crônico de IBP (WORTHLEY et al., 2011). Os familiares em risco devem ser rastreados por teste de mutação germinativa do promotor IB da APC para iniciar avaliação e vigilância endoscópica oportuna.

A polipose da glândula fúndica com displasia associada foi descrita em indivíduos afetados a partir dos 10 anos de idade, e o primeiro caso relatado de adenocarcinoma ocorreu em um paciente de 33 anos. Todos os parentes de primeiro grau devem ser submetidos a endoscopia e colonoscopia, este último para excluir polipose adenomatosa familiar e outras síndromes de polipose gastrointestinal (BEER et al., 2017).

Os familiares devem realizar endoscopias anuais a partir dos 40 anos de idade, ou com idade correspondente a 5 anos antes da idade diagnóstica do caso índice. Não existe indicação para gastrectomia profilática, exceto na impossibilidade de manejo endoscópico (RUDLOFF, 2018).

**Quadro 2.** Critérios diagnósticos para adenocarcinoma gástrico e polipose proximal do estômago.

- Pólipos gástricos restritos ao corpo e fundo, sem evidência de polipose duodenal ou colorretal
- Mais de 100 pólipos atapetando o estômago proximal no caso índice, ou mais de 30 pólipos em um parente de primeiro grau de outro caso
- Predominância de pólipos de glândulas fúndicas, alguns com regiões de displasia (ou um membro da família apresentando polipose displásica de glândulas fúndicas ou adenocarcinoma gástrico)
- Um padrão de herança autossômico dominante
- Exclusão de outras síndromes hereditárias de polipose gástrica e exclusão do uso de inibidores de bomba de prótons

Fonte: WORTHLEY et al., 2011- Adaptado

## **1.8 CÂNCER GÁSTRICO FAMILIAL INTESTINAL (FIGC)**

A FIGC é uma síndrome que cursa com câncer gástrico do tipo intestinal sem polipose gástrica. Possui um padrão de herança autossômico dominante, porém a causa genética subjacente é desconhecida. Portanto, não existe um teste genético diagnóstico para esta condição (OLIVEIRA et al., 2015; CARVALHO et al., 2020).

A FIGC é definida de acordo com a incidência do GC, conforme acordado pelo *International Gastric Cancer Linkage Consortium*. Em países de alta incidência de CG, o critério diagnóstico é análogo ao critério de Amsterdã para o câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC). Os critérios incluem: i) pelo menos três parentes devem ter CGI e um deles deve ser parente de primeiro grau dos outros dois; ii) pelo menos duas gerações sucessivas devem ser afetadas; iii) e em um dos familiares, o GC deve ser diagnosticado antes dos 50 anos. Em países com baixa incidência são utilizados os seguintes critérios: i) pelo menos dois parentes de primeiro grau (FDR) ou parentes de segundo grau (SDR) afetados pelo IGC, um diagnosticado antes dos 50 anos; ii) ou três ou mais parentes com IGC em qualquer idade (CALDAS et al., 1999).

**Quadro 3.** Critérios diagnósticos para Câncer Gástrico Familiar Intestinal pelo International Gastric Cancer Linkage Consortium

Países de alta incidência (Portugal, Japão)

- Pelo menos três parentes devem ter câncer gástrico intestinal e um deles deve ser o parente de primeiro grau dos outros dois
- Pelo menos 2 gerações sucessivas devem ser afetadas
- Em um dos familiares, o câncer gástrico deve ser diagnosticado antes dos 50 anos

Países de baixa incidência (Reino Unido, EUA)

- Pelo menos 2 parentes de primeiro ou segundo grau afetados por câncer gástrico intestinal, um diagnosticado antes dos 50 anos; ou
- Três ou mais parentes com câncer gástrico intestinal em qualquer idade

Fonte: CALDAS et al., 1999

Os pacientes diagnosticados devem realizar acompanhamento endoscópico anual a partir dos 40 anos de idade, ou 5 anos antes da idade diagnóstica do familiar mais novo afetado. Não há indicação de gastrectomia profilática.

## 1.9 CÂNCER GÁSTRICO DIFUSO HEREDITÁRIO

Uma parcela dos pacientes com câncer gástrico difuso está associada a síndromes hereditárias de câncer gástrico (CGDH) devido a mutações heterozigóticas germinativas no gene da E-caderina (E-cad, também conhecido como CDH1). A incidência de CGDH devido à mutação da germinativa de CDH1 varia de 1% a 3%. O CGDH possui herança autossômica dominante. Em 30-50% dos pacientes com CGDH, considera-se ser possível a identificação de alelos germinativos mutados da E-caderina (CDH1). Nas demais famílias, os fatores que determinam a suscetibilidade permanecem desconhecidos (GALL; FRAMPTON, 2013).

Essa característica familiar do câncer gástrico difuso foi inicialmente observada e descrita em 1964, em uma família Maori da Nova Zelândia, investigando-se gerações afetadas. As primeiras evidências de associação da mutação E-caderina com câncer gástrico difuso foram relatadas em 1994 (BECKER et al., 1994). Em 1998, a mutação germinativa da E-caderina foi identificada, associada e confirmada como causa do câncer gástrico hereditário nessas famílias Maori (GUILFORD et al., 1998). Posteriormente, mutações germinativas de CDH1

semelhantes foram relatadas no câncer gástrico difuso em famílias de origem do norte da Europa e em outras regiões.

A maioria dos pacientes com CGDH desenvolve câncer gástrico do tipo difuso entre 14 e 69 anos. Em contraste, o tumor esporádico é mais comum entre a quinta e sétima década de vida. É interessante destacar que nas famílias de pacientes com CGDH o risco de desenvolver câncer lobular de mama é de 42% até os 80 anos, enquanto o risco de câncer de mama esporádico na população é de 12,5% (CORSO et al., 2016).

### **1.9.1 CDH1**

O CDH1 é um gene supressor de tumor altamente conservado entre as espécies. Localizado no cromossomo 16q22.1, abrange cerca de 100 kb. Compreende um conjunto de 16 éxons e 15 íntrons (BERX et al., 1995). Transcreve a E-caderina, uma proteína de 120- kDa, que pertence a uma família de glicoproteínas transmembrana conservadas, as caderinas. A superfamília das caderinas é composta pelas caderinas clássicas, que são os principais componentes da junção aderente célula-célula; caderinas não clássicas, que incluem caderinas desmossomais; e proto-caderinas, que atuam na plasticidade neuronal. A E-caderina ou caderina epitelial pertence à subfamília do tipo I, as caderinas clássicas (STEMMLER, 2008).

Expressa na lateral de células epiteliais, a E-caderina é uma molécula de adesão dependente de cálcio e desempenha importante função na arquitetura de tecidos organizados, por meio da formação de complexos com outras proteínas citosólicas (NIESSEN; GOTTARDI, 2008).

Sua estrutura é formada por três domínios: um único domínio curto citoplasmático, conectado por meio de um segmento transmembrana ao domínio extracelular longo dependente de cálcio.

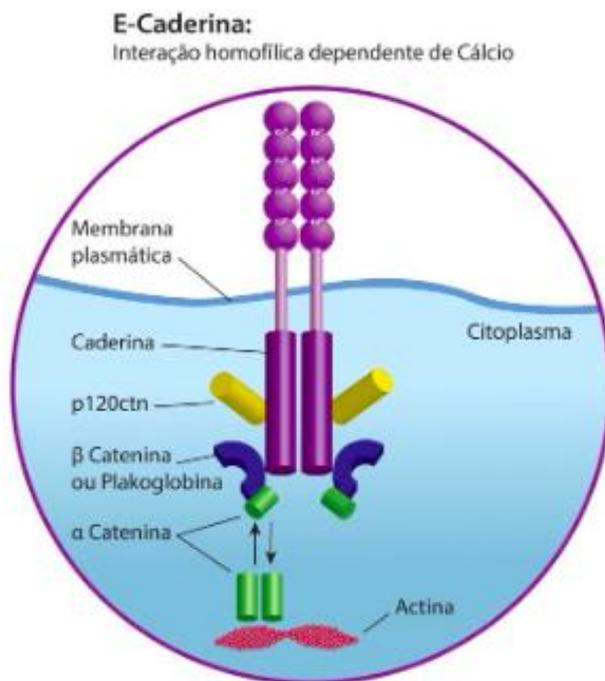
O domínio extracelular conecta-se por meio de uma ligação homofílica à molécula de caderina da célula adjacente utilizando íons de cálcio, formando homodímeros, e atua como uma ‘dobradiça’, impedindo o afrouxamento entre as células e promovendo rigidez à conexão (GALL; FRAMPTON, 2013).

O domínio extracelular é composto por cinco repetições de caderina (EC) que constituem o elemento básico para sua classificação. Esses domínios extracelulares são sequências de 110 resíduos que estão presentes apenas nas caderinas, comumente denominados

EC1-EC5. O domínio longo E1 é o principal responsável pelas propriedades aderentes das caderinas, que são organizadas entre as células em uma estrutura semelhante a um zíper (PEINADO *et al.*, 2004).

A conformação normal da caderina só é estável se houver  $\text{Ca}^{2+}$  no ambiente adjacente. A ligação deste na porção extracelular da cadeia polipeptídica é essencial para a adesão celular. Os sítios de ligação de cálcio consistem em pequenas sequências de aminoácidos, aproximadamente 150, altamente conservadas localizadas entre repetições de EC vizinhas.

O domínio citoplasmático interage com os filamentos do citoesqueleto por meio de um conjunto de proteínas adaptadoras/conectivas chamadas cateninas (p120,  $\beta$ -catenina e  $\alpha$ -catenina). Essa estrutura promove a estabilidade e organização celular, e inibe a mobilidade celular individual (WHEELLOCK; JOHNSON, 2003).



**Figura 10.** Representação esquemática da molécula de E-caderina (*Art Station, scientific illustration*, 2016).

### 1.9.2 E-CADERINA E “VIAS DE SINALIZAÇÃO” NO CÂNCER

O mecanismo exato das mutações do CDH1 no processo da carcinogênese continua sendo investigado, assim como sua função na carcinogênese. O papel específico da E-caderina no processo do desenvolvimento reflete-se na interação complexa de diversas vias de sinalização. O complexo E-caderina-catenina atua nos mecanismos de adesão celular, além da sinalização direta ou indireta para o núcleo e citoesqueleto por meio da interação com outras vias, como  $\beta$ -catenina, RhoGTPase, NF- $\kappa$ B e sinalização de EGFR independente de adesão (SHENOY, 2019).

Mutações no gene CDH1 com perda de função da E-caderina levam ao processo de EMT (transição epitélio-mesenquimal) no qual a célula perde sua capacidade de adesão celular e polaridade apical.

Alterações genéticas ou epigenéticas na E-caderina levam a alterações na adesão celular epitelial e estrutura celular, interações estromais aberrantes, além de desarmonia na migração e sinalização celular, promovendo a tumorigênese.

- **Via E-cad/ $\beta$ -catenin/Wnt**

A  $\beta$ catenina desempenha um papel essencial na adesão celular como uma proteína conectora que liga a E-caderina ao citoesqueleto de actina. Também representa um componente essencial na sinalização da via Wnt.

Sob condições fisiológicas, a  $\beta$ -catenina citoplasmática permanece em estado inativo pela ligação ao complexo de degradação APC / GSK3 $\beta$  / Axin / CK1 e sofre fosforilação para a ubiquitinação. A sinalização Wnt inibe esse processo degradativo, fosforilando e inibindo o complexo GSK3 $\beta$ . Isso aumenta o limiar crítico da  $\beta$ -catenina no citoplasma, necessário para ser transportado para o núcleo. Sob condições permissivas que amplificam a via de sinalização Wnt aberrante, tais como fatores parácrinos do ambiente tumoral, citocinas de células estromais e TNF- $\alpha$  de macrófagos, a  $\beta$ -catenina se transporta para o núcleo e liga-se às proteínas TCF-4 / LEF-1 para induzir os genes-alvo Wnt tais como c-Myc, ciclinas, MMP. Esse processo leva à proliferação e ao crescimento descontrolados de células (GOTTARDI *et al.*, 2001).

Na ausência de E-caderina, a  $\beta$ -catenina não associada ao complexo caderina-catenina leva ao excesso de  $\beta$ -catenina citoplasmática. Foi demonstrado que a  $\beta$ -catenina usa o mesmo sítio de ligação para ativar os ligandos do TCF e da E-caderina, e as caderinas têm uma afinidade de

ligação superior. Existe a hipótese de que, à medida que a E-caderina é perdida, um excesso de  $\beta$ -catenina citoplasmática, que escapa à degradação, entra no núcleo para se ligar ao TCF e ativar a via Wnt. Além de ativar genes associados a Wnt downstream, também é demonstrado que a translocação nuclear de  $\beta$ -catenina reprime a expressão de PTEN. O PTEN é um supressor de tumor e um regulador crítico da via AKT/MTOR. Assim, o funcionamento Wnt / $\beta$ -catenina /E-cad pode atuar em favor da proliferação celular descontrolada que promove a oncogênese (JEANES *et al.*, 2008).

- **Via E-Cad/EGFR/RAS/RAF/MEK**

Outra função da E-caderina é a inibição das vias de EGFR por meio da sua co-localização com EGFR no contato célula-célula. A mutação da E-caderina está associada à ativação do EGFR dependente de ligantes, e dos efetores downstream através das vias RAS/RAF/MEK, além de outras vias pró-tumorigênicas, como FAK/c-Src e via PI3K/AKT/MTOR, contribuindo assim para o aumento da proliferação e motilidade celular. Além disso, a perda de E-cad está associada ao aumento da translocação de  $\beta$ -catenina no núcleo, conforme descrito anteriormente. Esta translocação de  $\beta$ -catenina reprime a expressão de PTEN (LI *et al.*, 2018).

- **Via E-cad/P-120/Rho/MAPK**

A família Rho de GTPases pertence à superfamília RAS. Eles atuam como um mediador molecular duplo e regulam muitos aspectos da dinâmica intracelular: citoesqueleto, motilidade e polaridade celular, proliferação celular. Normalmente, quando a E-caderina é perdida, as células sofrem apoptose por meio de um processo chamado anoikis, uma forma de morte celular programada que ocorre após a perda da adesão celular, da arquitetura e polaridade das células (NAM *et al.*, 2019).

A análise funcional das mutações sugere que a RhoA ativada inibe o processo de anoikis. Outro mecanismo de ativação de RhoA ocorre indiretamente através da interação com a proteína p120. Além de ter um papel fisiológico na junção aderente, a proteína p120 ligante da E-caderina, estabiliza as junções aderentes e suprime as vias RhoA e NF- $\kappa$ B. No entanto, após o silenciamento da E-caderina, essa regulação negativa do RhoA é perdida e o p120 promove o crescimento celular ativando e modulando a RhoGTPase, ativando a atividade RAS / RAC / MAPK, além da ativação mediada por Rho das vias inflamatórias NF- $\kappa$ B (BCL, IL -6, TNF)

(COWELL et al., 2009). Demonstrou-se que o Cag A de *H. pylori* (gene A associado a citotoxicidade) pode causar silenciamento epigenético do gene CDH1, ativando Rho através do GRB / SHP-2 e downstream à via RAF / MEK / ERK (KOURTIDIS *et al.*, 2013).

- **Via E-Cad/Snail, Slug, Twist and Zeb-1**

A caderina-E também desempenha um papel importante na transição epitélio mesenquimal por meio da supressão de fatores de transcrição: snail, slug, twist e Zeb-1. Esses fatores estão envolvidos na diferenciação de células epiteliais em células mesenquimais (EMT). A perda da E-caderina promove a transição de célula epitelial para célula mesenquimal (EMT) e, portanto, perda de polaridade celular e ativação da motilidade. Snail, Twist e Zeb-1, anteriormente conhecidos por inibir a E-caderina, estavam entre os fatores de transcrição regulados positivamente após a perda de E-caderina (CANO et al., 2000).

A perda da arquitetura celular leva a um fenótipo mesenquimal, com capacidade migratória importante na doença metastática. As células perdem marcadores de citoqueratina e a própria E-caderina, enquanto ganham outros marcadores mesenquimais, como o vimentina e a N-caderina. A perda de proteína E-caderina pode ser justificada pela mutação germinativa, como observado em GCHD, ou devido à superexpressão de fatores inibidores de transcrição (snail/slug/twist/zeb) por carcinomas avançados. Esse fenômeno também é chamado de silenciamento transcricional. Esse processo leva à invasão e metástases (ONDER et al., 2008).

### **1.9.3 ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM CDH1**

A penetrância do gene CDH1 é incompleta. Aproximadamente 30%-50% das famílias acometidas por CGDH podem portar a mutação (OLIVEIRA et al., 2009).

CDH1 é um gene supressor de tumor, logo os dois alelos precisam ser silenciados para que haja perda da proteína. É necessário um segundo evento para inativação do gene e tumorigênese. Os mecanismos de perda do segundo alelo do CDH1 podem incluir hipermetilação do promotor do gene causando silenciamento epigenético, mutações somáticas e perda de heteroziguidade (OLIVEIRA et al., 2009).

No CGDH, as alterações genéticas causais já descritas encontram-se dispersas por toda a extensão do gene. Nesta síndrome cerca de 80% das mutações germinativas do CDH1 são truncantes, isto é, resultam na perda da proteína, causada por códons de parada prematuros. Mutações truncantes no gene CDH1 promovem a produção de proteínas anormalmente curtas e não funcionais, levando à ruptura do complexo caderina-catenina e perda da adesão celular, resultando no aumento da mobilidade celular, crescimento celular e divisão celular fora de controle, e aumento do potencial metastático do tumor (LUO et al., 2018).

Outros 20% das mutações de CGDH são do tipo missense, resultando em E-caderinas com substituição de aminoácidos. O impacto funcional desse tipo de mutação não é sempre evidente e permanece, na maioria dos casos, sob investigação. Para definir esta situação de incerteza criou-se o termo VUS (Variant of Uncertain Significance) Variante de Significado Clínico Incerto (MELO et al., 2017).

#### **1.9.4 TESTES GENÉTICOS EM CGDH**

De acordo com as diretrizes do *International Gastric Cancer Linkage Consortium 2020* (IGCLC), deve-se suspeitar da presença de mutação no gene CDH1 da família que apresentar as seguintes características: i) dois ou mais familiares diagnosticados com câncer gástrico em qualquer idade com pelo menos um caso de CG do tipo difuso confirmado; ii) um ou mais familiares diagnosticados com CGD em qualquer idade e um ou mais familiares diagnosticados com câncer lobular de mama antes dos 70 anos, em diferentes membros da família; iii) dois ou mais familiares diagnosticados com câncer lobular de mama em idade inferior a 50 anos. Adicionalmente, deve-se investigar mutação no CDH1 em indivíduos com história pessoal de: i) câncer gástrico difuso diagnosticado antes dos 50 anos de idade; ii) CGD em indivíduos da etnia Maori em qualquer idade; iii) CGD em indivíduos com história pessoal ou familiar (parentes de primeiro grau) de fenda labial ou palatina; iv) CGD e câncer lobular de mama, ambos diagnosticados antes dos 70 anos; v) câncer lobular de mama bilateral diagnosticado antes dos 70 anos; vi) presença de células em anel de sinete ou disseminação pagetóide de células em anel de sinete em indivíduos com menos de 50 anos (BLAIR et al., 2020).

Ressalta-se que todos os critérios que utilizam o termo “familiar” referem-se á parentes de primeiro ou segundo grau. Sempre que possível, testa-se o indivíduo afetado. Se não houver parentes vivos, considera-se a testagem de tecidos (tumoral ou saudável) de um parente afetado

já falecido. Na ausência das possibilidades citadas, considera-se o teste indireto de um familiar não afetado.

As diretrizes do IGCLC destacam que é necessária a confirmação histológica de pelo menos um caso para preencher critérios que envolvem dois ou mais cânceres. Ressalta ainda que confirmação histológica de câncer gástrico do tipo intestinal ou câncer de mama não-lobular não caracterizam CGDH, portanto não devem ser considerados.

**Quadro 4.** Critérios para teste genético Câncer Gástrico Difuso Hereditário de acordo com o *International Gastric Cancer Linkage Consortium 2020*

Recomenda-se teste genético para CDH1 o indivíduo com diagnóstico de CG que preencher pelo menos um dos seguintes critérios:

Critérios Familiares

- $\geq 2$  familiares diagnosticados com câncer gástrico em qualquer idade com pelo menos um caso de CG do tipo difuso confirmado
- $\geq 1$  familiar diagnosticado com CGD em qualquer idade +  $\geq 1$  familiar diagnosticado com câncer lobular de mama antes dos 70 anos, em diferentes membros da família
- $\geq 2$  familiares diagnosticados com câncer lobular de mama em idade inferior a 50 anos

Critérios Individuais

- CGD diagnosticado antes dos 50 anos de idade
- CGD em indivíduos da etnia Maori em qualquer idade
- CGD em indivíduos com história pessoal ou familiar (parentes de primeiro grau) de fenda labial ou palatina
- CGD e câncer lobular de mama, ambos diagnosticados antes dos 70 anos
- LBC bilateral em idade inferior aos 70 anos

Fonte: BLAIR et al., 2020

Recomenda-se o teste genético do gene CDH1 em indivíduos com diagnóstico de câncer confirmado que apresentem um dos critérios supracitados. Adicionalmente, considera-se a análise do gene CTNNA1 caso as investigações iniciais sejam negativas para variantes patogênicas no gene CDH1. Se ambas as análises forem negativas, considera-se “*HDGC-like*” (BLAIR et al., 2020).

Aconselhamento genético é crucial no cuidado de pacientes portadores de mutações no CDH1. Os testes genéticos devem ser oferecidos no início da vida adulta àqueles que preencherem os critérios anteriormente descritos. Pode-se considerar o teste para indivíduos menores de 18 anos baseado na história familiar (GAYTHER et al., 1998).

Quando possível, o aconselhamento genético deve incluir a avaliação do histórico familiar de três gerações, e levar em consideração qualquer história de câncer lobular de mama, fenda labial ou palatina e a presença de lesões precursoras ou diagnóstico de câncer gástrico difuso com confirmação histopatológica.

O sequenciamento do gene CDH1 pode ser realizado na amostra de sangue ou tecido, seguido pela análise de deleção ou duplicação direcionada ao gene. Para se ter um diagnóstico mais preciso o ideal é que a análise de CDH1 deve incluir a matriz de leitura completa, limites do íntron-exon e análise de variação no número de cópias para detectar deleções intragênicas de exon ou duplicações (POST et al., 2015). Aproximadamente 155 mutações germinativas diferentes foram descritas, e a maioria dessas mutações patogênicas é truncante (HANSFORD et al., 2015).

Se a análise de mutação de CDH1 e CTNNA1 for negativa, considera-se análise multigênica para outros genes de suscetibilidade ao CGDH, MAPK, BRCA2, STK11, SDHB, PRSS1, ATM, MSR1 e PALB2. As mutações identificadas nestes genes são, na maioria dos casos, muito raras, dificultando a obtenção de conclusões específicas sob sua verdadeira contribuição para o desenvolvimento da doença (BLAIR et al., 2020; POST et al., 2015).

Cerca de 20% das mutações no CDH1 podem ser mutações VUS (variantes de significado desconhecido) cuja consequência ainda não está clara. Esses casos, correlacionadas com dados de familiares, devem ser considerados para avaliações complementares, incluindo a bioinformática e análise de imagens, quantificação de proteínas, estudos *in silico*, análise de expressão, e uma série de testes realizados em células de cultura *in vitro*, objetivando reunir informações úteis sobre os possíveis efeitos patogênicos dessas mutações VUS (HANSFORD et al., 2015).

Além das mutações descritas, o silenciamento de E-caderina também pode ocorrer por outros mecanismos, incluindo alterações de microRNAs (miRNAs), metilação da região promotora e perda de heterozigosidade (MELO et al., 2017).

### **1.9.5 RECOMENDAÇÕES PARA A PRÁTICA CLÍNICA**

A idade média de diagnóstico em CGDH é de 38 anos. Quando sintomas específicos aparecem, a doença está tipicamente em estágios avançados, com metástases, e apresenta prognóstico ruim. Análise de amostras retiradas após gastrectomia profilática de pacientes que possuem mutação patogênica de CDH1, usualmente, descrevem múltiplos focos neoplásicos de

células em anel de sinete na base das glândulas, juntamente com o padrão infiltrativo pagetoide de disseminação, sob uma mucosa histologicamente normal. Em casos avançados, o estômago pode apresentar-se espessado e rígido, um fenômeno conhecido como linite plástica (HUNTSMAN et al., 2001).

Os familiares que testarem positivo para mutação germinativa patogênica devem ser aconselhados à gastrectomia total profilática entre 20 e 30 anos, independente de achados endoscópicos, para prevenir o câncer gástrico. Àqueles que renunciarem à cirurgia, deve-se oferecer triagem e vigilância endoscópica anual em centros especializados e experientes, seguindo o protocolo de Cambridge, além da erradicação do *H. pylori* se positivo (BLAIR et al., 2020).

Às famílias portadoras de HDGC-like, ou seja, não portadoras de mutações germinativas patogênicas conhecidas, não recomenda-se gastrectomia total profilática. Indica-se triagem endoscópica anual por pelo menos dois anos consecutivos. Uma vez que a biópsia positiva é mais provável na primeira endoscopia, os intervalos de vigilância endoscópica podem ser prolongados a critério do endoscopista, considerando-se achados individuais e história familiar. A triagem deve começar aos 40 anos ou 10 anos antes da idade diagnóstica do membro mais jovem da família afetado (BLAIR et al., 2020).

As recomendações atuais são endoscopia digestiva alta dedicada anuais com duração de 30 min, utilizando luz branca de alta definição com biópsia de quaisquer lesões suspeitas visíveis, incluindo mucosa pálida. Além disso, biópsias profundas aleatórias devem ser obtidas da área pré-pilórica, antro, zona de transição, corpo, fundo e cárdia. Recomenda-se um mínimo de 30 biópsias. O estômago deve ser inflado e aspirado sob análise cuidadosa para verificar anormalidades de distensão, sugestivas de comprometimento parietal. Se o estômago parecer rígido e suspeito de linite plástica, deve-se realizar uma ultrassonografia endoscópica ou uma tomografia computadorizada com protocolo de distensão gástrica para avaliar, detalhadamente, as camadas da parede. As imagens devem ser salvas para comparações futuras (KUMAR et al., 2019).

Apesar dos avanços nas técnicas e tecnologias endoscópicas, a detecção de focos neoplásicos em portadores de CDH1 é baixa. A avaliação de amostras cirúrgicas pós-gastrectomia demonstram neoplasia de anel de sinete em 45%-60% daqueles com avaliações endoscópicas negativas. Outras ferramentas como a cromoendoscopia com vermelho do Congo e o corante azul de metileno não são recomendadas pela toxicidade associada aos corantes e baixa capacidade de detecção de CGDH (KOUWEN et al., 2004).

- **Câncer de mama associado a mutações do CDH1**

O câncer lobular de mama geralmente se apresenta como camadas de células neoplásicas e não forma uma massa bem definida, como o câncer ductal invasivo. Portanto, a sensibilidade da mamografia para detectar LBC não é ideal.

As mulheres portadoras de mutação no gene CDH1 devem realizar acompanhamento clínico com um oncologista e cirurgião da mama, realizando os exames clínicos anuais da mama e a triagem do câncer lobular de mama. As recomendações de triagem incluem ressonância magnética bilateral da mama a partir dos 30 anos. A quimioprevenção de pacientes de alto risco deve ser considerada de acordo com as diretrizes, usando moduladores seletivos de receptores de estrogênio ou inibidores da aromatase. Considera-se mastectomia bilateral profilática, na dependência de aconselhamento genético oncológico, em casos selecionados, de portadores de mutação patogênica no CDH1. Além disso, deve-se realizar vigilância endoscópica anual e considerar gastrectomia total profilática (SHENOY, 2019; BLAIR et al., 2020).

- **Gastrectomia total profilática**

Dada a natureza assintomática do DGC e o padrão de crescimento irregular e de difícil reconhecimento, é possível que o tumor permaneça inerte e, posteriormente, progrida rapidamente. Estima-se que o risco de CGD seja de 1% aos 20 anos de idade e aumente para 4% aos 30 anos nas famílias portadoras (PHAROAH et al., 2001a).

Quando os sintomas aparecem, o prognóstico é ruim e a maioria dos pacientes é diagnosticada com doença avançada. Além disso, esses portadores de mutação têm penetrância alta, mas variável e imprevisível. A gastrectomia total profilática é uma opção apropriada para estes pacientes. Lewis e colaboradores foram os primeiros cirurgiões a recomendar gastrectomia total profilática para pacientes assintomáticos com mutações no CDH1. Sua recomendação foi baseada no achado de câncer difuso oculto em amostras pós-gastrectomia de seis membros assintomáticos de famílias portadoras de mutações (LEWIS et al., 2001).

Posteriormente, outros autores publicaram dados semelhantes. Huntsman e colaboradores descreveram uma série de 5 pacientes de famílias com mutação no CDH1 submetidas a gastrectomia total profilática. Todos os pacientes apresentaram evidência de CGDH na patologia final, não identificadas na endoscopia pré-operatória (HUNTSMAN et al., 2001).

Da mesma forma, Norton e colaboradores relataram câncer gástrico difuso oculto em seis pacientes com mutação CDH1 submetidos à gastrectomia total profilática. Todas as amostras de gastrectomia ressecadas apresentaram presença de CGD invasivo multifocal T1, sem envolvimento linfonodal (NORTON et al., 2007).

A idade ideal para realizar a gastrectomia profilática deve ser individualizada, no entanto, a maioria dos autores recomenda que ela seja realizada no início da idade adulta entre 20 e 30 anos de idade, ou 5 anos antes da idade diagnóstica do parente de primeiro grau mais jovem a desenvolver câncer gástrico. As portadoras de mutação que desejam engravidar, eventualmente, devem considerar adiar suas cirurgias para evitar complicações decorrentes de deficiências nutricionais e metabólicas do gastrectomizado (PHAROAH et al., 2001b).

A gastrectomia total apresenta alta morbidade, com considerável impacto no bem-estar psicológico, fisiológico e metabólico. É necessária abordagem de uma equipe multidisciplinar. Os portadores de mutação CDH1 devem se aconselhar com geneticista clínico, psicólogo, nutricionista, além de cirurgião e oncologista, e devem contar com apoio no período pós-operatório. Parâmetros nutricionais como albumina sérica e pré-albumina devem ser otimizados. A doença metastática deve ser descartada com imagens apropriadas, como uma tomografia computadorizada do abdome e da pelve, além de tomografia do tórax (POST et al., 2015).

A técnica mais amplamente realizada é a gastrectomia total com remoção de toda mucosa gástrica com reconstrução esôfago-jejunal em Y de Roux. O procedimento é realizado com técnicas abertas ou laparoscópicas/robóticas. A vantagem da abordagem laparoscópica/robótica é a redução da dor pós-operatória e a recuperação mais rápida. A incidência pós-operatória de fístula, estenose, outros fatores que aumentam morbidade e maior tempo de hospitalização não é estatisticamente diferente quando se compara uma anastomose mecânica versus manual (MASTORAKI et al., 2011).

Fragmentos das margens devem ser congelados e investigados para garantir que a mucosa proximal do esôfago e a mucosa duodenal distal estejam livres de doença, e de tecido gástrico ectópico, assegurando a ressecção total da mucosa gástrica. Atenção especial deve ser prestada aos pacientes portadores de divertículo de Meckel, pois este pode conter mucosa gástrica ectópica e deve ser ressecado no mesmo ato cirúrgico (PANTELIS et al., 2016).

Em geral, pacientes mais jovens apresentam recuperação satisfatória, pois a maioria não possui doença de base. A mortalidade cirúrgica é inferior a 1% em centros experientes.

A extensão da dissecação dos linfonodos permanece incerta. Para gastrectomia profilática, antes da detecção do câncer gástrico, não deveria haver doença linfonodal, recomendando-se, apenas, linfadenectomia D1 (linfonodos peri-gástricas, 1 a 6). Para pacientes com câncer gástrico confirmado, é necessária uma linfadenectomia D2 (SCHMIDT; YOON, 2012).

As complicações da gastrectomia são mais graves em pacientes idosos com agravos fisiológicos e nutricionais. Se não tratado, o CGDH pode ter 100% de mortalidade devido ao desenvolvimento de doença metastática.

A gastrectomia total está associada a uma significativa perda de peso. A rápida perda ocorre inicialmente e é seguida pela estabilização do peso em um ou dois anos após a cirurgia, com uma perda de peso permanente média de 10 a 15%. Os pacientes operados podem apresentar trânsito intestinal rápido, refluxo, síndrome de dumping e diarreia (WORSTER et al., 2014a).

Esses sintomas podem ser inicialmente graves, melhorar e estabilizar com o tempo. Estudos de qualidade de vida indicam alta associação com ansiedade e depressão. Pacientes mais jovens do sexo masculino têm melhor qualidade de vida e perspectivas em comparação a pacientes do sexo feminino e idosos.

Há um aumento no risco de distúrbios metabólicos relacionados à gastrectomia. Dentre as deficiências comuns, incluem-se: de cálcio, vitamina D, ferro e vitamina B12. Pode ocorrer crescimento bacteriano excessivo, o que pode exacerbar ainda mais a deficiência nutricional e a desnutrição protéico-calórica. Pacientes pós-gastrectomia requerem suplementos vitamínicos ao longo da vida (WORSTER et al., 2014b).

A gravidez após gastrectomia total é viável e relatada com resultados normais. As gestantes devem ser monitoradas de perto quanto a deficiências nutricionais na mãe e crescimento e desenvolvimento do feto.

### **1.9.6 DESPROPORÇÃO ENTRE DIAGNÓSTICOS MOLECULARES E DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS**

Conforme exposto anteriormente, o CGDH é doença grave e potencialmente letal, se não identificada e conduzida adequadamente em fases menos avançadas, que permitam o sucesso terapêutico, ou, ainda, intervenções redutoras de risco como a gastrectomia total profilática (SHENOY, 2019).

Entretanto, não obstante muitos casos preencherem critérios clínicos compatíveis com a síndrome, o número de confirmações moleculares de mutações patogênicas de CDH1 ou CTNNA1 são desproporcionalmente baixos, mesmo quando todas as tecnologias de investigações moleculares estão disponíveis (ASSUMPCÃO et al., 2020).

Especialmente no Brasil, o número de diagnósticos moleculares de CDH1 é irrisório, diante do número de casos clínicos compatíveis com a síndrome. Diante desta constatação, a hipótese de que outras alterações moleculares, adicionais àquelas de CDH1 e CTNNA1 já reconhecidas como causais, possam estar presentes e complementar o espectro do diagnóstico molecular de CGDH, requer investigação.

Dentre as potenciais investigações que permitam a exploração de outros alvos moleculares, capazes de justificar casos clinicamente evidentes de CGDH não contemplados nos critérios moleculares atuais, a investigação de exomas completos por meio de sequenciamento de nova geração desponta dentre as mais promissoras.

## **1.10 EXOMA**

A estratégia para a identificação das mutações por meio do sequenciamento completo do exoma, metodologia de biologia molecular que utiliza o sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *Next-Generation Sequencing*) permite o rastreamento de todos os genes, ampliando significativamente a possibilidade de novas descobertas, relacionadas à síndrome de CGDH.

O NGS é um conjunto de ferramentas que permitem uma abordagem de sequenciamento em larga escala (HGS – High throughput sequencing). Tem como princípio o sequenciamento em paralelo de enormes quantidades de cadeias curtas de DNA a partir de cópias fragmentadas aleatoriamente de um genoma, sem exigir conhecimento prévio do genoma em si (YAMAMOTO et al., 2014).

O uso do NGS substituiu parcialmente o sequenciamento Sanger convencional e é uma abordagem muito versátil. Além de constituir-se em tecnologia de alto rendimento, econômica e rápida, também oferece uma ferramenta mais abrangente e precisa para a análise de genomas, exomas, epigenomas e retrotranscritas (VERMA; SHARMA, 2018).

O sequenciamento do exoma abrange todos os éxons de genes codificadores de proteínas, o que representa de 1 a 2% do genoma. Engloba, adicionalmente, os elementos codificadores

funcionais não proteicos (por exemplo, microRNA, RNA intergênico longo não codificante, etc.) bem como loci candidatos específicos (WARR et al., 2015).

A tecnologia usada para o sequenciamento completo do exoma divide o DNA em pequenos fragmentos e em seguida isola e sequênciia os fragmentos de DNA provenientes de éxons (MAHON, 2016).

A grande maioria das variantes já identificadas como responsáveis por doenças estão localizadas em éxons. Assim, a restrição à porção codificante do genoma reduz o custo de sequenciamento e a complexidade na interpretação dos dados gerados, mantendo a cobertura das regiões genômicas de maior interesse das investigações clínicas (KAMPS et al., 2017).

O sequenciamento de exoma se beneficia da disponibilidade de grandes bancos de dados de SNPs conhecidos, variantes já descritas como patogênicas na literatura, e genomas de controle (KAMPS et al., 2017).

A aplicação das tecnologias NGS na caracterização de tumores permitiu avanços significativos na compreensão das bases biológicas de diferentes tipos de câncer, descoberta de biomarcadores genômicos de resposta e resistência a medicamentos, e identificação de indivíduos sob risco, contribuindo, ainda, para o desenvolvimento de potenciais terapias e intervenções direcionadas (BERGER; MARDIS, 2018).

Tem sido amplamente utilizado no reconhecimento de assinaturas genômicas para identificação de genes predisponentes a cânceres familiares. Além de possibilitar um melhor acompanhamento a longo prazo dos pacientes diagnosticados, inclusive na prevenção e detecção de segundas neoplasias, a identificação de mutações associadas a um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer proporciona a investigação de familiares próximos sob risco, direcionando estratégias de prevenção e detecção precoce do câncer (CHEN et al., 2018).

O sequenciamento completo do exoma tem o potencial de permitir o teste de todos os genes-alvo possíveis de uma só vez, eliminando o tempo prolongado e o custo adicional do teste de genes sequenciais. Isso pode ser particularmente útil em distúrbios complexos como o câncer, no qual os pacientes podem portar múltiplas variantes que modificam seu risco.

## **1.11 ALTERAÇÕES GERMINATIVAS NÃO VALORIZADAS PODERIAM CONTRIBUIR PARA CASOS CLÍNICOS DE HGC**

Especificamente no CGDH, apenas mutações específicas em CDH1 ou CTNNA1 são reconhecidas como eventos germinativos relevantes na carcinogênese (SUN et al., 2013).

Entretanto, conforme discutido, o número de casos com hipótese clínica de CGDH com confirmação molecular é, especialmente no Brasil, muito menor do que o relatado mundialmente, remetendo-se à hipótese da eventual participação de outras alterações genéticas neste processo (ASSUMPCÃO et al., 2020).

Exomas de casos clínicos de CGDH demonstram diversas mutações germinativas funcionais que afetam o gene CDH1, ou a via CDH1, isto é, genes que interagem fortemente com CDH1, além de muitos outros genes relacionados ao câncer, independentes da via de CDH1. Novamente, o papel dessas mutações, isoladamente, ou o impacto quantitativo não são valorizados no desenvolvimento da CGDH.

Considera-se, hipoteticamente, que mutações monoalélicas herdadas, em genes importantes para o câncer, poderiam representar um risco adicional para o processo da carcinogênese.

Adicionalmente, é pertinente a suposição de que a presença de mais de uma mutação germinativa de alto impacto funcional resulte em aumento potencial na chance de haver um segundo evento somático.

Em tese, iniciar a vida com diversas mutações germinativas monoalélicas, em genes relevantes para a carcinogênese, proporcionaria múltiplos alvos para um segundo evento somático. Assim, quanto maior o número de mutações germinativas, especialmente em genes supressores de tumor, maior a chance de segundos eventos somáticos, e, portanto, maior o risco de câncer, incluindo pacientes mais jovens.

Uma estratégia de abordagem múltipla foi definida buscando testar a hipótese: o número total de mutações germinativas (GMB) e o número de mutações funcionais em grupos de genes específicos, os subsets GHFI (mutações germinativas de alto impacto funcional), GMEd (mutações germinativas de alto impacto funcional em genes com descrição clínica de doenças em geral), GHallmark (mutações germinativas de alto impacto funcional em genes descritos com hallmarks), GRepRep (mutações germinativas de alto impacto funcional em genes de replicação e reparo), GCDH1path (mutações germinativas de alto impacto funcional em genes da via CDH1), foram comparados a indivíduos sem câncer.

## 2. JUSTIFICATIVA

Diante de uma neoplasia com elevada incidência em pessoas jovens, associada a graves manifestações clínicas e alta mortalidade, torna-se evidente a necessidade de traçar novas estratégias diagnósticas e terapêuticas, além de buscar a identificação de indivíduos sob risco para o CG.

Considerando-se os indivíduos que preenchem os critérios clínicos, apenas uma pequena parcela apresenta mutações descritas como patogênicas na literatura, que indiquem o seguimento clínico recomendado. Ressalta-se ainda, a dificuldade no acesso aos testes moleculares, pouco disponíveis na prática clínica.

A lacuna existente entre o diagnóstico clínico e molecular dificulta o manejo e prevenção entre familiares que poderiam se beneficiar de uma investigação que possibilitasse o estabelecimento de modalidades terapêuticas com maiores índices de cura, ou até mesmo evitar o desenvolvimento, altamente provável, de uma doença grave.

Em investigação preliminar realizada pelo grupo de pesquisas envolvido neste estudo, a identificação de uma mutação patogênica em uma família de indivíduos paraenses possibilitou a proposição de uma estratégia inovadora na região, cujos resultados esperados, caso confirmados, poderão consolidar um novo padrão de rastreamento a ser implantado no Estado.

Trata-se no rastreio da mutação, a partir do núcleo populacional da família e expandida à região territorial em torno deste núcleo, por meio de um teste não invasivo, utilizando saliva coletada pelo próprio sujeito da pesquisa, na qual se investiga a presença da mutação.

Neste grupo dois casos confirmados permitiram a realização de cirurgias redutoras de risco, ambos com neoplasias gástricas precoces, situação na qual a chance de cura é muito elevada, mudando suas trajetórias e expectativas e diferenciando-as daquelas vivenciadas por alguns de seus familiares, diagnosticados em fases avançadas e já falecidos em consequência da doença.

Ademais, a origem populacional dos paraenses carrega significativa contribuição Ameríndia, grupo ancestral caracterizado pelo escasso conhecimento sobre risco genético para doenças, e, em especial, neste caso, para o CG.

Supõem-se, que mutações eventualmente presentes nos Ameríndios e, portanto, não reconhecidas como patogênicas para o CG, possam responder, em parte, pela citada discrepância entre diagnósticos clínicos e moleculares, dentre os paraenses.

Pretende-se, com a estratégia proposta, expandir o número de mutações atribuíveis ao risco de CG no Estado, ampliando-se, assim, a possibilidade de rastreamentos e a chance de benefícios a muitos outros indivíduos desta população de alto risco.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar e descrever mutações germinativas de potencial interesse clínico em pacientes jovens com adenocarcinoma gástrico.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar avaliação quantitativa objetivando investigar o número total de mutações germinativas (GMB) e o número de mutações funcionais em grupos de genes específicos e compará-los com os números encontrados no grupo controle sem câncer.
- Descrever mutações germinativas de elevado impacto funcional potencialmente relacionadas ao risco de câncer gástrico em pacientes jovens.

## 4. CAPÍTULO 1. LYMPH NODES MAY BE A SOURCE FOR IMMUNETHERAPY IN GASTRIC CANCER

### Lymph nodes may be a source for immunotherapy in gastric cancer

Paula Baraúna Assumpção<sup>1,2</sup>, Erika Couto Canelas<sup>2</sup>, Aline Cruz Ramos<sup>2</sup>, Ana Anaissi<sup>2,4</sup>, João Felipe Acioli<sup>2,3</sup>, Geraldo Ishak<sup>2,3</sup>, Sidney Santos<sup>1,2</sup>, Samia Demachki<sup>2,4</sup> and Paulo Assumpção<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório Genética Humana e Médica, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brasil

<sup>2</sup>Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Belém-PA, Brasil

<sup>3</sup>Serviço de Cirurgia do Hospital Universitário João de Barros Barreto, Belém-PA, Brasil

<sup>4</sup>Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brasil

Correspondence to: Paulo Assumpção, email: [assumpcaopp@gmail.com](mailto:assumpcaopp@gmail.com)

Keywords: gastric cancer; immunotherapy; lymph nodes

Received: January 15, 2020

Accepted: April 10, 2020

Published: May 12, 2020

Copyright: Assumpção et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

#### ABSTRACT

**Background:** adoptive immunotherapy is a promising cancer therapy. Immune cells are capable of recognizing and destroying cancer cells and represent a powerful strategy, however, this approach remains technically complicated, due to the need to select and isolate immune cells from these, present cancer antigens to those cells, expanding and reinjecting them. Lymph nodes recovered during gastric cancer surgery may represent an option for immunotherapy, since they harbor an enormous amount of immune cells, which have already been presented to cancer antigens. The advantage of selecting only cancer- negative lymph has not been determined yet. The status of immune checkpoints in the immune cells within the lymph nodes was analyzed in order to try to solve this problem.

**Materials and Methods:** Tissue microarrays were constructed and automated immunostaining for PD-1 and PD-L1 was performed on 143 lymph nodes from 70 patients with gastric adenocarcinoma.

**Results:** In positive nodes, PD-L1 was only positivity in cancer cells (6%) and PD-1 was positive for B lymphocytes (60%), T lymphocytes (70%) and one case in cancer cells (2.5%). In negative nodes, most cases were positive for PD-1 in B (73.1%) and T (71.65%) lymphocytes.

**Conclusions:** Expression of PD-1 and PD-L1 in gastric cancer lymph nodes was demonstrated for the first time. PD-1 is expressed in positive and negative nodes, which could activate the PD-1 pathway. Lymphocytes from tumor-free lymph nodes were negative for PD-L1, and this might represent an advantage for selecting these lymph nodes as a potential source of immune cells for adoptive immunotherapy.

#### INTRODUCTION

Elements of the immune repertoire have gained increased attention since “avoidance of immune response” as one of the hallmarks of cancer [1] and introduction of immune check point therapy for diverse cancer types [2–5]. Nevertheless, the importance of preserving effectors of the immune system (such as lymphocytes in regional lymph nodes) that do not harbor cancer cells, seems to be under- valued.

Classical immune treatments, including adoptive therapy [6], have evolved to include the refined *ex-vivo* manipulation of diverse cells from the immune set, which has allowed innovative approaches both in clinical practice and as part of ongoing experimental and translational innovations [7–11]. The resection of regional lymph nodes in gastric cancer surgery is considered one of the most relevant advances, since it seems to be associated with benefits both in the reduction of local recurrence and probably in terms of survival [12–14].

**Table 1: Immunostaining for PD-1 and PD-L1 in positive lymph nodes according to histopathologic characteristics**

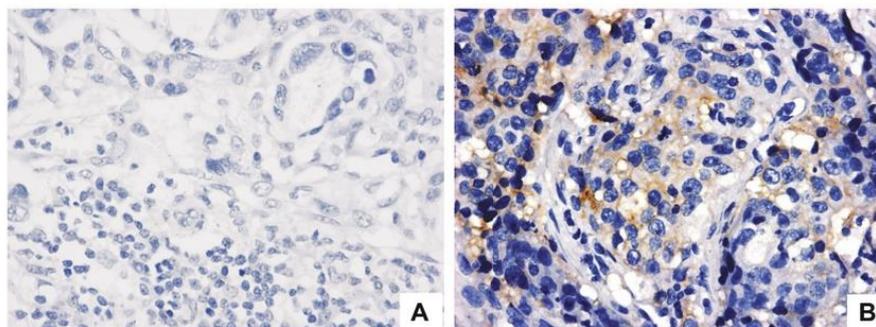
Histopathological Features		PD-L1			PD-1	
		Negative	Positive		Negative	Positive
<i>Histologic grade</i>	<i>n = 30 (%)</i>			<i>n = 40 (%)</i>		
<i>G1 (well differentiated)</i>	19 (63,3)	17 (56,6)	2 (6,7)	28 (70)	7 (17,5)	21 (52,5)
<i>G2 (Moderately differentiated)</i>	2 (6,7)	2 (6,7)	0	2 (5)	1 (2,5)	1 (2,5)
<i>G3 (Poorly differentiated)</i>	9 (30)	9 (30)	0	10 (25)	4 (10)	6 (15)
<i>Histologic type</i>						
<i>Intestinal</i>	19 (63,3)	17 (56,6)	2 (6,7)	28 (70)	7 (17,5)	21 (52,5)
<i>Diffuse</i>	9 (30)	9 (30)	0	10 (25)	4 (10)	6 (15)
<i>Mixed</i>	2 (6,7)	2 (6,7)	0	2 (5)	1 (2,5)	1 (2,5)
<i>pT</i>						
<i>T1 (early)</i>	1 (3,3)	1 (3,3)	0	2 (5)	0	2 (5)
<i>T2, T3 e T4 (Advanced)</i>	29 (96,7)	27 (90)	2 (6,7)	37 (92,5)	12 (30)	25 (62,5)
<i>Not reported</i>	0	0	0	1 (2,5)	0	1 (2,5)
<i>Pn</i>						
<i>N1</i>	4 (13,3)	4 (13,3)	0	6 (15)	1 (2,5)	5 (12,5)
<i>N2</i>	12 (40)	12 (40)	0	14 (35)	3 (7,5)	11 (27,5)
<i>N3</i>	14 (46,7)	12 (40)	2 (6,7)	20 (50)	8 (20)	12 (30)
<i>pM</i>						
<i>Mx</i>	28 (93,3)	26 (86,6)	2 (6,7)	37 (92,5)	10 (25)	27 (67,5)
<i>M1</i>	2 (6,7)	2 (6,7)	0	3 (7,5)	2 (5)	1 (2,5)

cells of the immune system [1] via the inhibition of the host response against the disease. Therefore, we realized that the selection and isolation of T cells and even other immune cells that are able to recognize and eliminate tumor cells, but that are not subjugated by cancer cells with the power to silence the immune response, might represent a potential approach to be investigated in gastric cancer immunotherapy.

Gastrectomy with lymphadenectomy is the standard surgical procedure for the treatment of gastric cancer [15, 16]. The systematic resection of lymph nodes provides a large number of both negative and positive lymph nodes,

depending on the stage of the disease. The large number of lymphocytes and/or other immune cells retrieved from the negative lymph nodes constitutes a source of possible “bullets” to be selected, saved, and improved, with the aim to allow efficient and targeted adoptive immunotherapy.

The presence of cancer cells in the lymph nodes, which are considered classical “positive nodes,” implies the possibility of an ongoing cancer cell strategy in which cancer cells escape the immune response. This was previously demonstrated by the activation of immune check points as a consequence of tumor cell expression of PD-L1 and other molecules in the tumor microenvironment.



**Figure 1: PD-L1 expression evaluation in regional lymph node with metastatic gastric adenocarcinoma (positive lymph node).** (A) Negative staining in neoplastic cells (magnification 40x). (B) PD-L1 positive cytoplasmic staining in neoplastic cells (magnification 40x).

**Table 2: Immunostaining for PD-1 and PD-L1 in B lymphocytes, T lymphocytes, macrophages and neoplastic cells from positive lymph nodes**

Cell Type	PD-L1	PD-1
	n = 30 (%)	n = 40 (%)
<b>B Lymphocytes</b>		
NEGATIVE (< 1%)	30 (100)	16 (40)
> 1–5%	0	0
> 5–10%	0	15 (37,5)
> 10–25%	0	9 (22,5)
<b>T lymphocytes</b>		
NEGATIVE < 1%	30 (100)	12 (30)
POSITIVE > 1–5%	0	28 (70)
<b>Macrophages</b>		
NEGATIVE < 1%	30 (100)	40 (100)
POSITIVE > 1–5%	0	0
<b>Neoplastic cells</b>		
NEGATIVE < 1%	28 (94)	39 (97,5)
POSITIVE > 1–5%	2 (6)	1 (2,5)

**Table 3: Immunostaining for PD-1 and PD-L1 in negative lymph nodes according to histopathologic characteristics**

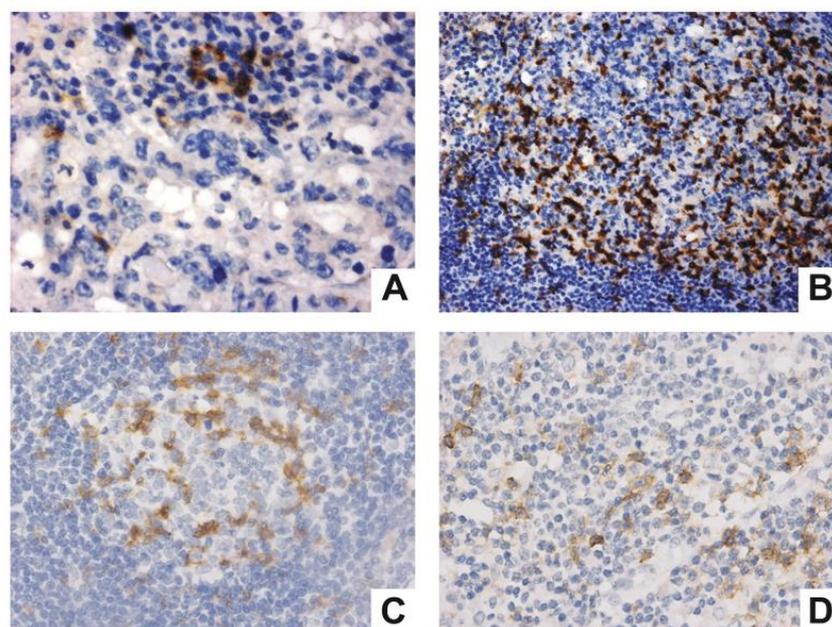
Histopathological Features		PD-L1		PD-1		
		Negative	Positive	Negative	Positive	
<i>Histologic grade</i>	<b>n = 68 (%)</b>			<b>n = 67 (%)</b>		
<i>G1 (well differentiated)</i>	48 (70,6)	48 (70,6)	0	48 (61,6)	13 (19,4)	35 (52,2)
<i>G2 (Moderately differentiated)</i>	2 (2,94)	2 (2,94)	0	2 (3)	0	2 (3)
<i>G3 (Poorly differentiated)</i>	18 (26,5)	18 (26,5)	0	17 (25,4)	3 (4,5)	14 (20,9)
<i>Histological type</i>						
<i>Intestinal</i>	48 (70,6)	48 (70,6)	0	48 (61,6)	13 (19,4)	35 (52,2)
<i>Diffuse</i>	18 (26,5)	18 (26,5)	0	17 (25,4)	3 (4,5)	14 (20,9)
<i>Mixed</i>	2 (2,94)	2 (2,94)	0	2 (3)	0	2 (3)
<i>pT</i>						
<i>T1 (early)</i>	10 (14,7)	10 (14,7)	0	10 (14,9)	2 (3)	8 (11,9)
<i>T2, T3 e T4 (Advanced)</i>	53 (77,9)	53 (77,9)	0	53 (79,1)	12 (17,9)	41 (61,2)
<i>Not reported</i>	5 (7,35)	5 (7,35)	0	4 (6)	2 (3)	2 (3)
<i>pN</i>						
<i>N0</i>	14 (20,6)	14 (20,6)	0	14 (20,9)	4 (6)	10 (14,9)
<i>N1</i>	13 (19,1)	13 (19,1)	0	13 (19,4)	2 (3)	11 (16,4)
<i>N2</i>	16 (23,5)	16 (23,5)	0	16 (23,9)	3 (4,5)	13 (19,4)
<i>N3</i>	20 (29,4)	20 (29,4)	0	21 (31,3)	6 (8,9)	15 (22,4)
<i>N4</i>	1 (1,5)	1 (1,5)	0	0	0	0
<i>Not reported</i>	4 (5,9)	4 (5,9)	0	3 (4,5)	1 (1,5)	2 (3)
<i>pM</i>						
<i>Mx</i>	66 (97)	66 (97)	0	64 (95,5)	15 (22,4)	49 (73,1)
<i>M1</i>	2 (3)	2 (3)	0	3 (4,5)	1 (1,5)	2 (3)

**Table 4: Immunostaining for PD-1 and PD-L1 in B lymphocytes, T lymphocytes, and macrophages from negative lymph nodes**

Cell Type	PD-L1	PD-1
	<i>n</i> = 68 (%)	<i>n</i> = 67 (%)
<b>B Lymphocytes</b>		
NEGATIVE (<1%)	68 (100)	18 (26,9)
> 1–5%	0	27 (40,3)
> 5–10%	0	19 (28,35)
> 10–25%	0	3 (4,5)
<b>T lymphocytes</b>		
NEGATIVE < 1%	68 (100)	19 (28,35)
POSITIVE > 1–5%	0	48 (71,65)
<b>Macrophages</b>		
NEGATIVE < 1%	65 (95,6)	65 (97)
POSITIVE > 1–5%	3 (4,4)	2 (3)

The results presented in this preliminary investigation are original since the only published data regarding PD-1 and PD-L1 expression in gastric cancer are related to either tumors [31] or non-cancer gastric mucosae [32]. The results from the current study also corroborate the hypothesis that negative lymph nodes seem to be free of the inhibition of the immune response, which is frequently found in the presence of malignant cells.

Although PD-1 expression was observed in the majority of both positive and negative lymph nodes, the activation of the PD-1 pathway depends on the concomitant expression of its ligand [24]. Since PD-L1 was not expressed in lymphocytes from negative nodes, even in those that expressed PD-1, the inhibition of the immune response by a PD1/PDL1 interaction would never occur, if these lymph nodes were the only ones selected for adoptive immunotherapy. In contrast, the expression



**Figure 2:** PD-1 expression evaluation in immune cells from positive lymph node (A, B) and negative lymph node (C, D). (A) PD-1 expression in T lymphocytes (Magnification 40×). (B) expression in centrofollicular B lymphocytes (Magnification 20×). (C) PD-1 expression in centrofollicular B lymphocytes of negative lymph node (Magnification 40×). (D) PD-1 expression in macrophage and T lymphocytes (magnification 40×).

of PD-L1 in “positive nodes” might inhibit the immune response by activation of the PD-1 pathway.

This strengthens the hypothesis of a possible negative influence of using lymphocytes exposed to tumor cells such as TILs or even lymphocytes from positive nodes. Obviously, after the administration of immune cells that have been expanded *in vitro*, the expression of PD-1 ligands and/or activation of other tumor mechanisms for avoiding the host immune system might protect some cancer cells from immune system attack and subsequent destruction.

As is the case in most wars, the enemies try to eliminate each other and protect themselves while in inconvenient environments. Nevertheless, the criteria for the selection of combatants to send to the battlefield favors the strongest and not ones who are easily subdued by the enemy, even though some might fail at their responsibilities.

The silencing of adoptive immune cells after infusion might occur independently of using cells derived from tumors or lymph nodes and might be circumvented by the concomitant use of immune check point antibodies, if required.

Additionally, PD-1 expression in selected lymphocytes could be definitively silenced *in vitro* by recently available techniques such as DNA editing [33], like CRISPR [34], which would thus avoid the activation of the PD-1 pathway after re-infusion of the lymphocytes, even in cases of tumors that express PD-1 ligands.

Nevertheless, it seems to make sense to select immune cells that are easily available from routinely retrieved lymph nodes and ones that are not exposed to silencing cues (PD-1 ligands and others), rather than collecting them from the tumor mass.

The small number of PD-L1-positive cells in this casuistry is in accordance with the expected positive expression of this binding protein in primary gastric cancers, since it seems to be related to the EBV molecular subtype, which is the least common among the gastric cancer subtypes [35].

The finding of PD-L1 expression in macrophages was previously reported [36] and might be related to the immune function of these cells, which phagocyte cancer cells and other cell types, and whose aim is to clear the microenvironment of harmful molecules that threaten tissue homeostasis.

Although modest, these preliminary results could be extrapolated to investigations of many other tumors, such as colon cancer, breast cancer and ovarian cancer, for which lymphadenectomy is also applied.

In conclusion, the expression of PD-1 and PD-L1 in lymph nodes retrieved during gastrectomies was demonstrated here for the first time. These proteins are expressed in lymphocytes from lymph nodes, but PD-L1 is not expressed in lymphocytes from negative lymph nodes. Negative for malignancy lymph nodes retrieved during gastrectomies might be considered a potential source for gastric cancer immunotherapy.

## MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Universidade Federal do Pará Ethics Committee with CAAE N° 43961215.9.0000.5634, all research was performed in accordance with relevant guidelines/regulations and all participants read and signed the written informed consent. One hundred and forty-three lymph nodes from 70 gastric adenocarcinoma patients who submitted to curative intended gastrectomy with D2 classical lymphadenectomies were selected for the analysis. The surgical specimens were evaluated by the same pathologist, and tumors were classified according to the Lauren and WHO standards, and according to the 8th edition of the UICC staging system.

Lymph nodes were initially assessed by conventional microscopy and were classified as positive (with metastasis) or negative (without metastasis). A total of 69 positive lymph nodes and 74 negative lymph nodes were initially stained and were analyzed by microscopy, after which, at least two, representative samples were selected from each node.

### Tissue microarrays (TMAs)

Histological sections from each tissue block were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) and were carefully reviewed by a pathologist. The most representative areas of each lymph node were selected for analysis. Cylindrical cores from the selected areas were removed to construct TMA blocks using TMA Grand Master (3DHISTECH Ltd.) according to the manufacturer’s instructions.

### Immunohistochemistry

The immunohistochemistry procedures were performed at Gx Ventana® (Ventana Medical Systems, Inc. Tucson, AZ, USA) with an Ultra View Universal Dab Detection Kit. Briefly, 3-µm- thick sections were obtained from the TMA blocks, and immunohistochemistry was performed using a rabbit polyclonal PDL-1 antibody (Abcam®, ab205921, 28-8, RabMab) at a 1:200 dilution and a mouse monoclonal PD-1 antibody (Abcam®, ab52587, NAT-105) at a 1:50 dilution. Both tumour cells and immune cells, such as B and T lymphocytes and macrophages, were analyzed. The criteria for positive PD-L1 protein staining in tumor cells was restricted to cytoplasmic membrane staining, either partially or completely, while for immune cells, membrane or cytoplasmic staining for both PD-L1 and PD-1 was considered positive [37].

In some cases, although the TMAs contained two samples from each case, due to technical problems, the analyses failed for one or both antibodies. These failures primarily include disruption of the samples, following

performing the transfer of the slices from the receptor blocks during construction of the TMA slides for staining with the selected antibodies.

### Author contributions

Paula Baraúna Assumpção, Erika Couto Canelas, Aline Cruz Ramos and Paulo Assumpção made the design of the work and wrote the main manuscript text. Paulo Assumpção, Geraldo Ishak and João Felipe Acioli, applied written informed consent to all the participants and collected the biological material. Samia Demachki and Ana Anaissi did the histopathologic analysis, the tissue microarray and the immunohistochemistry. Sidney Santos did the analysis and interpretation of data. Paulo Assumpção, Samia Demachki and Sidney Santos supervised the work of all. All authors reviewed the manuscript.

### CONFLICTS OF INTEREST

All authors declare no competing statements.

### REFERENCES

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144:646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>. [PubMed]
2. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12:252–264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>. [PubMed]
3. Alme AK, Karir BS, Faltas BM, Drake CG. Blocking immune checkpoints in prostate, kidney, and urothelial cancer: an overview. *Urol Oncol*. 2016; 34:171–81. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2016.01.006>. [PubMed]
4. Bidaur S, Savdie R, Black PC. Inhibiting Immune Checkpoints for the Treatment of Bladder Cancer. *Bladder Cancer*. 2016; 2:15–25. <https://doi.org/10.3233/BLC-150026>. [PubMed]
5. Swart M, Verbrugge I, Beltman JB. Combination Approaches with Immune-Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Front Oncol*. 2016; 6:233. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00233>. [PubMed]
6. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA, Simpson C, Carter C, Bock S, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med*. 1988; 319:1676–1680. <https://doi.org/10.1056/NEJM198812223192527>. [PubMed]
7. Carlsten M, Childs RW. Genetic Manipulation of NK Cells for Cancer Immunotherapy: Techniques and Clinical Implications. *Front Immunol*. 2015; 6:266. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00266>. [PubMed]
8. Radice E, Bellone G, Miranda V. Enhancement of the Immunostimulatory Functions of *Ex Vivo*-Generated Dendritic Cells from Early-Stage Colon Cancer Patients by Consecutive Exposure to Low Doses of Sequential-Kinetic-Activated IL-4 and IL-12. A Preliminary Study. *Transl Oncol*. 2015; 8:327–338. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2015.06.005>. [PubMed]
9. Sharpe M, Mount N. Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Dis Model Mech*. 2015; 8:337–350. <https://doi.org/10.1242/dmm.018036>. [PubMed]
10. Digiusto DL, Kiem HP. Current translational and clinical practices in hematopoietic cell and gene therapy. *Cytotherapy*. 2012; 14:775–790. <https://doi.org/10.3109/14653249.2012.694420>. [PubMed]
11. Visoni A, Skitzki J. Technical Considerations for the Generation of Adoptively Transferred T Cells in Cancer Immunotherapy. *Cancers*. 2016; 8:86. <https://doi.org/10.3390/cancers8090086>. [PubMed]
12. Adachi Y, Oshiro T, Okuyama T, Kamakura T, Mori M, Maehara Y, Sugimachi K. A simple classification of lymph node level in gastric carcinoma. *Am J Surg*. 1995; 169:382–5. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(99\)80181-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(99)80181-0). [PubMed]
13. Karpeh MS, Leon L, Klimstra D, Brennan MF. Lymph Node Staging in Gastric Cancer: Is Location More Important Than Number?: An Analysis of 1,038 Patients. *Ann Surg*. 2000; 232:362–371. <https://doi.org/10.1097/0000658-200009000-00008>. [PubMed]
14. Schmidt B, Yoon SS. D1 Versus D2 Lymphadenectomy for Gastric Cancer. *J Surg Oncol*. 2013; 107:259–264. <https://doi.org/10.1002/jso.23127>. [PubMed]
15. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer*. 2011; 14:101–112. <https://doi.org/10.1007/s10120-011-0041-5>. [PubMed]
16. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2014 (ver. 4). *Gastric Cancer*. 2017; 20:1–19. <https://doi.org/10.1007/s10120-016-0622-4>. [PubMed]
17. Rosa F, Costamagna G, Doglietto GB, Alfieri S. Classification of nodal stations in gastric cancer. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2017; 2:2. <https://doi.org/10.21037/tgh.2016.12.03>. [PubMed]
18. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, Morton KE, Laurencot CM, Steinberg SM, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2011; 17:4550–57. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0116>. [PubMed]
19. Wang LX, Huang WX, Graor H, Cohen PA, Kim JA, Shu S, Plautz GE. Adoptive immunotherapy of cancer with polyclonal, 108-fold hyperexpanded, CD4+ and CD8+ T cells. *J Transl Med*. 2004; 2:41. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-2-41>. [PubMed]

20. Visioni A, Zhang M, Graor H, Kim J. Expansion of melanoma-specific T cells from lymph nodes of patients in stage III: implications for adoptive immunotherapy in treating cancer. *Surgery*. 2012; 152:557–65. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2012.07.002>. [PubMed]
21. Saito H, Kuroda H, Matsunaga T, Osaki T, Ikeguchi M. Increased PD-1 Expression on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells Is Involved in Immune Evasion in Gastric Cancer. *J Surg Oncol*. 2013; 107:517–522. <https://doi.org/10.1002/jso.23281>. [PubMed]
22. Sabatier R, Finetti P, Mamessier E, Adelaide J, Chaffanet M, Ali HR, Viens P, Caldas C, Birnbaum D, Bertucci F. Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget*. 2015; 6:5449–64. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3216>. [PubMed]
23. Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, Tran E, Wunderlich JR, Mixon A, Farid S, Dudley ME, Hanada K, Almeida JR, Darko S, et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8<sup>+</sup>-tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest*. 2014; 124:2246–2259. <https://doi.org/10.1172/JCI73639>. [PubMed]
24. de Guillebon E, Roussille P, Frouin E, Tougeron D. Anti program death-1/anti program death- ligand 1 in digestive cancers. *World J Gastrointest Oncol*. 2015; 7:95–101. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v7.i8.95>. [PubMed]
25. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol*. 2016; 7:550. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00550>. [PubMed]
26. Besser MJ, Shapira-Frommer R, Treves AJ, Zippel D, Itzhaki O, Hershkovitz L, Levy D, Kubi A, Hovav E, Chermoshniuk N, Shalmon B, Hardan I, Catane R, et al. Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res*. 2010; 16:2646–2655. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0041>. [PubMed]
27. Zhang G, Zhao H, Wu J, Li J, Xiang Y, Wang G, Wu L, Jiao S. Adoptive immunotherapy for non-small cell lung cancer by NK and cytotoxic T lymphocytes mixed effector cells: retrospective clinical observation. *Int Immunopharmacol*. 2014; 21:396–405. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.04.026>. [PubMed]
28. Kono K, Takahashi A, Ichihara F, Amemiya H, Iizuka H, Fujii H, Sekikawa T, Matsumoto Y. Prognostic Significance of Adoptive Immunotherapy with Tumor-associated Lymphocytes in Patients with Advanced Gastric Cancer: A Randomized Trial. *Clin Cancer Res*. 2002; 8:1767–71. [PubMed]
29. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011; 480:480–489. <https://doi.org/10.1038/nature10673>. [PubMed]
30. Sunay ME, Marincola F, Khleif SN, Silverstein SC, Fox BA, Galon J, Emens L. Focus on the target: the tumor microenvironment. Society for Immunotherapy of Cancer Annual Meeting Workshop, October 24th–25th 2012. *J Immunother Cancer*. 2013; 1:9. <https://doi.org/10.1186/2051-1426-1-9>.
31. Lee SM, Chow LQ. A new addition to the PD-1 checkpoint inhibitors for non-small cell lung cancer—the anti-PDL1 antibody—MEDI4736. *Transl Lung Cancer Res*. 2014; 3:408–410. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2014.11.10>. [PubMed]
32. Das S, Suarez G, Beswick EJ, Sierra JC, Graham DY, Reyes VE. Expression of B7-H1 on gastric epithelial cells: its potential role in regulating T cells during Helicobacter pylori infection. *J Immunol*. 2006; 176:3000–3009. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.5.3000>. [PubMed]
33. Calos MP. Genome Editing Techniques and Their Therapeutic Applications. *Clin Pharmacol Ther*. 2017; 101:42–51. <https://doi.org/10.1002/cpt.542>. [PubMed]
34. Chira S, Gulei D, Hajitou A, Zimta AA, Cordelier P, Berindan-Neagoe I. CRISPR/Cas9: transcending the reality of genome editing. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017; 7:211–222. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.04.001>. [PubMed]
35. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014; 513:202–209. <https://doi.org/10.1038/nature13480>. [PubMed]
36. Schalper KA, Carvajal-Hausdorf D, McLaughlin J, Velcheti V, Chen L, Sanmamed M, Herbst RS, Rimm DL. Clinical significance of PD-L1 protein expression on tumor-associated macrophages in lung cancer. *J Immunother Cancer*. 2015; 3:P415. <https://doi.org/10.1186/2051-1426-3-S2-P415>.
37. Scheel AH, Dietel M, Heukamp LC, Jöhrens K, Kirchner T, Reu S, Rüschoff J, Schildhaus U, Schirmacher P, Tiemann M, Warth A, Weichert W, Fischer RN, et al. Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2016; 29:1165–1172. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.117>. [PubMed]

## 5. CAPÍTULO 2. HEREDITARY GASTRIC CANCER: THREE RULES TO REDUCE MISSED DIAGNOSES



Submit a Manuscript: <https://www.f6publishing.com>

World J Gastroenterol 2020 April 7; 26(13): 1382-1393

DOI: 10.3748/wjg.v26.i13.1382

ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)

OPINION REVIEW

### Hereditary gastric cancer: Three rules to reduce missed diagnoses

Paula Assumpção, Taíssa Araújo, André Khayat, Geraldo Ishak, Sidney Santos, Williams Barra, João Felipe Acioli, Benedito Rossi, Paulo Assumpção

**ORCID number:** Paula Assumpção (0000-0003-2625-8037); Taíssa Araújo (0000-0002-1716-4445); André Khayat (0000-0002-3451-6369); Geraldo Ishak (0000-0002-0837-4803); Sidney Santos (0000-0002-9417-8622); Williams Barra (0000-0001-8954-4212); João Felipe Acioli (0000-0003-4344-7921); Benedito Rossi (0000-0003-2614-4910); Paulo Assumpção (0000-0003-3846-8445).

**Author contributions:** All authors equally contributed to this paper in terms of the conception and design of the study, literature review and analysis, drafting and critical revision and editing, and approval of the final version.

**Conflict-of-interest statement:** No potential conflicts of interest. No financial support.

**Open-Access:** This article is an open-access article that was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution NonCommercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

**Manuscript source:** Unsolicited Manuscript

**Received:** December 10, 2019

**Peer-review started:** December 10,

Paula Assumpção, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará, Belém 66075-110, Brazil

Taíssa Araújo, André Khayat, Sidney Santos, Williams Barra, Paulo Assumpção, Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará, Belém 66073-000, Brazil

Geraldo Ishak, João Felipe Acioli, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Universidade Federal do Pará, Belém 66073-000, Brazil

Benedito Rossi, Centro de Oncologia e Aconselhamento Genético, Hospital Sirio Libanês, São Paulo 01308-050, Brazil

**Corresponding author:** Paulo Assumpção, MD, PhD, Academic Research, Adjunct Professor, Surgical Oncologist, Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará, Rua dos Mundurucus 4487, Belém 66073-000, Brazil. [assumpcaopp@gmail.com](mailto:assumpcaopp@gmail.com)

#### Abstract

Gastric cancer remains one of the most lethal cancers. The incidence and mortality rates are quite similar. The main reason for the high mortality is diagnosis at advanced stages of disease, when treatment options are poor. One of the supposed strategies to overcome late-stage diagnosis is identifying people at high risk with the aim of establishing rigorous clinical control, including routine endoscopy and biopsies. Hereditary gastric cancer (HGC) syndromes, though representing a sizeable group to monitor for prevention or, at least, for early diagnosis, are apparently extremely rare. The low rate of HGC diagnosis might be related to the low rates of suspicion, insufficient familiarity about clinical diagnosis criteria, and the supposed conditional necessity of a molecular diagnosis. In this review, we will discuss simple measures to increase HGC diagnosis by applying three rules that might provide an opportunity for precision care to benefit the families affected by this disease.

**Key words:** Hereditary gastric cancer; Rules; Diagnosis

©The Author(s) 2020. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Core tip:** Although familial gastric cancer cases represent a potential source for the discovery of early-stage gastric cancer (and others) among patients' relatives, this possibility has been little explored due to the low rate of suspicion of hereditary gastric cancer syndromes, which could be improved by applying simple rules for hereditary gastric cancer screening that are accessible for unskilled healthcare professionals.

2019

**First decision:** February 14, 2020**Revised:** February 17, 2020**Accepted:** March 9, 2020**Article in press:** March 9, 2020**Published online:** April 7, 2020**P-Reviewer:** Eleftheriadis N,  
Tanabe S**S-Editor:** Gong ZM**L-Editor:** A**E-Editor:** Zhang YL**Citation:** Assumpção P, Araújo T, Khayat A, Ishak G, Santos S, Barra W, Acioli JF, Rossi B, Assumpção P. Hereditary gastric cancer: Three rules to reduce missed diagnoses. *World J Gastroenterol* 2020; 26(13): 1382-1393**URL:** <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v26/i13/1382.htm>**DOI:** <https://dx.doi.org/10.3748/wjg.v26.i13.1382>

## GASTRIC ADENOCARCINOMA CAUSES AND PREVENTION

The main recognized causes of gastric adenocarcinoma are environmental, hereditary, and replicative DNA errors<sup>[1-3]</sup>. Measures to avoid environmental exposition are widely discussed, mainly *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) prevention and treatment and changes in alimentary habits<sup>[4]</sup>. For replicative causes, there are no currently available alternatives for risk reduction<sup>[5,7]</sup>.

Hereditary cancers, although representing a potential group for prevention and early diagnosis, seem to be disregarded, or even neglected, since their incidence is very uncommon, causing preventive measures to have low impact on gastric cancer burden and mortality.

## THE HEREDITARY GASTRIC CANCER SYNDROMES

The incidence of hereditary gastric cancer (HGC) is approximately 1%, and a degree of genetic influence seems to be present in over 10% of sporadic gastric cancer (GC) cases<sup>[8]</sup>.

The discrepancy in HGC incidence might be explained by two different concepts: Molecular diagnosis; and diagnosis based on meeting clinical statements for hereditary cancers without a molecular diagnosis; patients diagnosed via the former also represent HGC cases<sup>[9,10]</sup>.

Since molecular diagnosis is tricky and not widely available, a focus on the clinical criteria for hereditary gastric cancer cases should increase the number of recognized cases and allow an intensive search for early diagnosis, as well as select a larger number of cases for practicing molecular investigations in reference centers.

There are three robustly identified HGC syndromes: Hereditary diffuse gastric cancer (HDGC); gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of stomach (GAPPS); and familial intestinal gastric cancer (FIGC). Additionally, GC may arise from other hereditary cancer syndromes, such as Lynch syndrome, Li-Fraumeni syndrome, Peutz-Jeghers syndrome, and ovarian and breast syndromes<sup>[11-13]</sup>.

The clinical criteria for each of these syndromes are not widely known, and as a consequence, the low rate of suspicion results in rare investigations and diagnoses of such syndromes.

Estimating the number of missed clinically diagnosable cases of HGC is extremely difficult. Nevertheless, missed diagnoses might represent a significant number of families that could benefit from such active searching and subsequent adoption of measures to allow for early diagnosis and efficient treatments.

## SIMPLE MEASURES TO INCREASE HEREDITARY GC DIAGNOSIS

Available initiatives to avoid sporadic GC are usually hard to implement since they include convincing the population to change alimentary habits, improving sanitary conditions in developing nations, and using large-scale antibiotics to treat *H. pylori*<sup>[6,7]</sup>.

For HGC diagnosis, simple measures should be attempted as a first step to increase health professional suspicion and favor clinical diagnosis.

Three simple rules, accessible to every health-care professional, could improve the clinical diagnosis of HGC and allow referencing of such cases to specialized centers, either for patients to receive support at local units or, eventually, for patients to be transferred to those centers to benefit from complex measures.

Observation of the three rules might greatly increase the number of diagnosed cases of HGC, providing an opportunity for precision care to benefit these families.

The suggested rules are the age and number rule, the multiple tumor rule, and the polyposis rule.

---

## THE AGE AND NUMBER RULE

---

This is the number one rule and allows capture of the great majority of HGC cases (probably more than 95% of cases). Since age of occurrence and number of affected relatives are part of the clinical criteria for almost every hereditary GC syndrome, a simple check of the patient's age and the occurrence of other cases among first- or second-degree relatives is sufficient to screen patients for a possible diagnosis of hereditary cancer<sup>[9,13,14]</sup> (Figure 1).

Patient age under 50, or the occurrence of at least one case of GC in relatives are enough to require further screening for hereditary GC syndromes and to implement protocols for family investigation and surveillance<sup>[13]</sup>.

These can be done primarily at the site of the first consultation, but specialized remote support can be beneficial either for conducting the necessary investigation and procedures using local resources or for referring the case to a dedicated unit for ideal management.

---

## THE MULTIPLE TUMOR RULE

---

The occurrence of additional cancers, both multiple GCs or cancers at other sites, such as breast, colon and others, might represent a potential for hereditary cancers<sup>[10,11]</sup> (Figure 2).

As discussed above, local and reference center investigations and management, according to available resources, are formally recommended.

---

## THE POLYPOSIS RULE

---

Although it is very rare, GC-associated polyposis is another sign of hereditary cancers even if they are not caught by the two previous rules. Both HGC syndromes and other hereditary cancer syndromes may cause GC and stomach polyposis<sup>[10,11,3]</sup> (Figure 3).

Again, according to the availability of resources, those cases might be managed locally or referred to another center.

---

## THE IMPACT OF THE THREE RULES IN CLINICAL PRACTICE

---

There are several criteria defining both HGC syndromes and other hereditary syndromes that might imply GC occurrence.

Considering only the three well-established HGC syndromes, at least 16 rules are currently published. Additionally, many of these rules are frequently updated, leading to a very complex net of possibilities to diagnose an HGC that, even for a specialist, let alone a generalist health worker, are very hard to remember<sup>[6,10,11,14]</sup>.

An attempt to simplify these many criteria resulted in a three-rule method for the triage of patients for possible HGC formal diagnosis. None of the official criteria for diagnosis were questioned or modified. The aim of this simple method is to help clinicians and other health-care members remain alert for these possible diagnoses.

To demonstrate the simplicity and potential benefits of increasing HGC identification by applying the three rules strategy, some practical possibilities will be discussed.

All the criteria defined in recent meetings and conferences<sup>[8,13]</sup> are covered by the three rules, which can be used by any health-care professional, including nonspecialized ones, contributing to the avoidance of missed diagnoses (Figure 4).

---

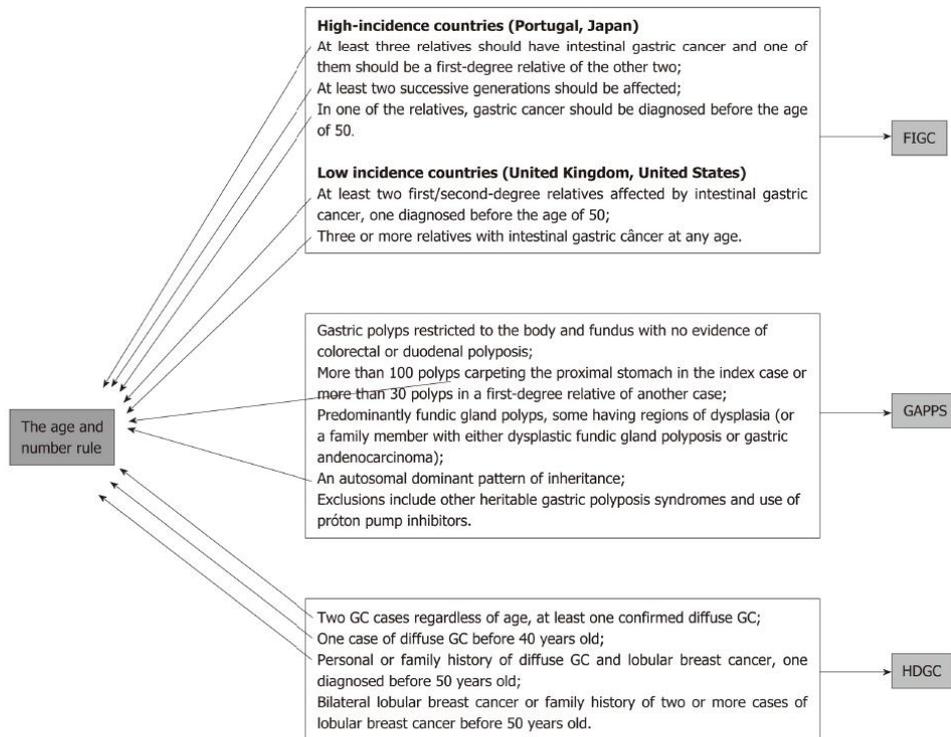
## THE POTENTIAL OF THE AGE AND NUMBER RULE IN CLINICAL PRACTICE

---

Just by applying this rule, a great number of cases can be selected for a possible diagnosis of HGC. The following examples present the minimal requirements that can favor the discovery of new HGC cases and imply important investigational and therapeutic procedures that might change the outlooks for patients and their relatives.

### **The 1 + 1 law**

A case of diffuse-type GC in a patient under 50 years old and a case of GC among first- or second-degree relatives, regardless of the type of adenocarcinoma, are enough



**Figure 1** Diagnosis criteria for hereditary gastric cancer caught by rule number 1. GC: Gastric cancer; FIGC: Familial intestinal gastric cancer; GAPPs: Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of stomach; HDGC: Hereditary diffuse gastric cancer.

to establish a formal diagnosis of HGC, and this is very important, since it implies the potential for a molecular test (*CDH1* mutation).

If positive, prophylactic total gastrectomy for the affected relatives might be necessary. Even with a negative genetic test, every first- and second-degree relative will need a dedicated endoscopy every year beginning at 20 years old. The standard number of first- and second-degree relatives older than 19 is over 20 individuals, and these are the people at high risk; in these individuals, rigorous surveillance may result in avoidance of late GC diagnosis and might change outcomes.

**The 1 + 0 law**

This not so alarming situation indeed also represents a formal diagnosis of HGC in the case of patients under 40 years old with diffuse GC. The same procedures described above are needed, including molecular investigation, possibility of prophylactic total gastrectomy, and engagement of the relatives in a rigorous program of follow-up beginning at 20 years old.

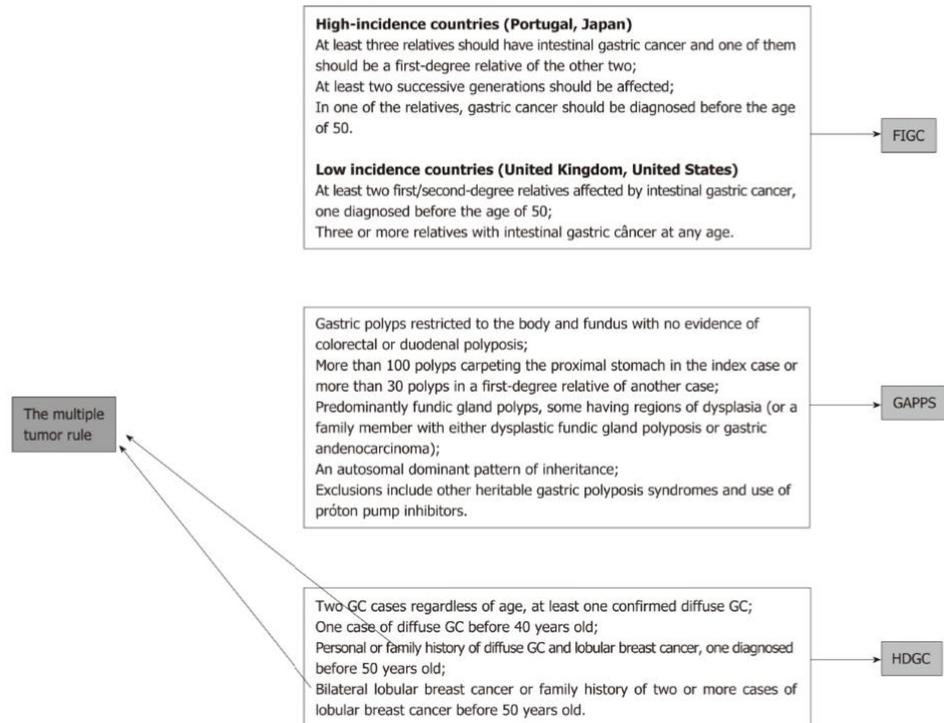
**The 0 + 2 law**

Regardless of the age of occurrence, if a patient has diffuse GC, independently of the relative gastric adenocarcinoma type, a formal diagnosis of HGC is again reached, with the same needs and consequences described above.

This situation also results in a formal diagnosis of HGC in cases of the intestinal type according to the familial intestinal gastric cancer syndrome criteria for low-risk areas. For this syndrome, there is no molecular test, and the recommendation includes annual endoscopies for first- and second-degree relatives beginning at 40 years old<sup>[9,11-16]</sup>.

**The 0 + 3 law**

Regardless of age or histological type of gastric adenocarcinoma, three or more cases of GC among first- or second-degree relatives always signify an HGC syndrome



**Figure 2** Diagnosis criteria for hereditary gastric cancer caught by rule number 2. GC: Gastric cancer; FIGC: Familial intestinal gastric cancer; GAPPS: Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of stomach; HDGC: Hereditary diffuse gastric cancer.

diagnosis, even in high-incidence areas. If every case is of the intestinal type, FIGC syndrome guidelines require annual endoscopies beginning at 40 years old for first- and second-degree relatives<sup>[9,11]</sup>.

When at least one diffuse GC case is present, a molecular test is necessary, and according to this result, total prophylactic gastrectomy or dedicated annual endoscopies starting at 20 years old will be necessary<sup>[9,11,16]</sup>.

Figure 5 presents some of the possibilities for identifying hereditary diffuse tumors via the application of rule number 1.

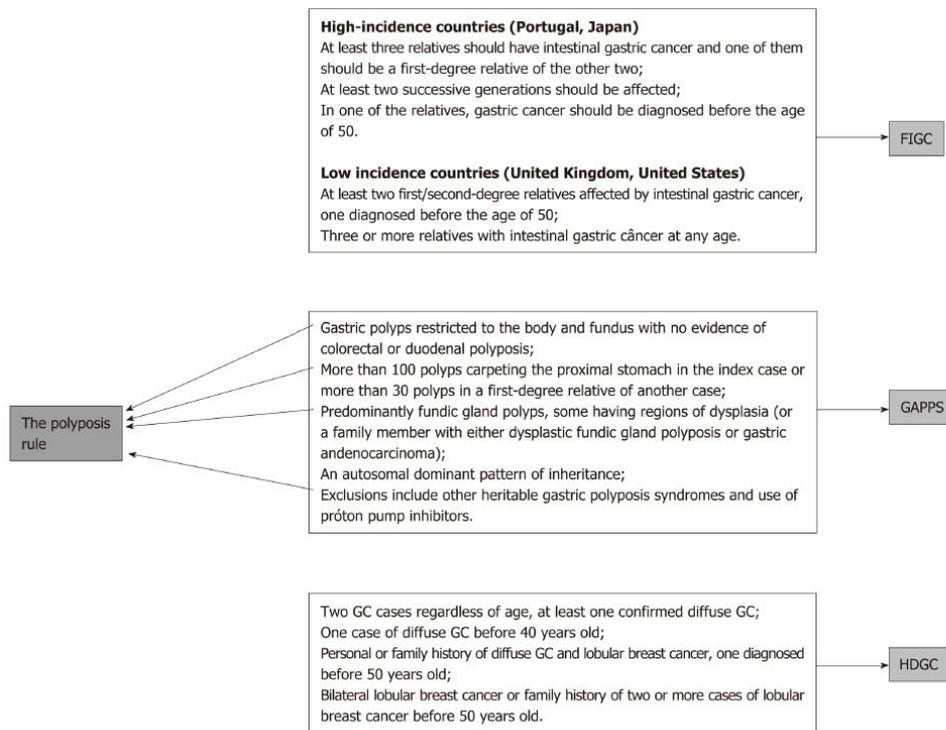
The management of hereditary diffuse gastric cancer syndrome is presented in Figure 6. With a clinical diagnosis of HDGC, there is a formal indication for genetic investigation by sequencing of the *CDH1* gene. If a functional mutation is discovered, every first- and second-degree relative will be investigated for that specific mutation by a much simpler and cheaper test, with no need for complete *CDH1* gene sequencing<sup>[11,17]</sup>.

Everyone who carries the functional mutation needs to be evaluated by a multiprofessional team including a cancer geneticist and accordingly may undergo a prophylactic total gastrectomy. In the case of a negative genetic test, or if the carrier of the mutation does not agree to undergo total gastrectomy, annual dedicated endoscopies are indicated, including multiple insufflation and deflation schemes and both random and directed biopsies carried out by a senior endoscopist<sup>[16,17]</sup>.

Regarding intestinal-type gastric cancers, rule number 1 will not result in a genetic test, but the patient's relatives identified by this rule will be included in a formal program of annual endoscopies beginning at 40 years old (Figure 7)<sup>[9,11,16]</sup>.

## POSSIBLE CONSEQUENCES OF THE POLYPOSIS RULE

Although extremely rare, the association of gastric polyposis and GC is a sign of HGC. GAPPS is very rare, with few affected families described. The main difference



**Figure 3** Diagnosis criteria for hereditary gastric cancer caught by rule number 3. GC: Gastric cancer, FIGC: Familial intestinal gastric cancer; GAPPs: Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of stomach; HDGC: Hereditary diffuse gastric cancer.

from other polyposis syndromes is the exclusive gastric involvement and the restricted localization of the polyps to the corpus and fundus. This syndrome is attributed to a mutation in the promoter region of the *APC* gene, the gene classically related to familial adenomatous polyposis, which is characterized by colon polyposis and also carries a risk for associated GC<sup>[18-20]</sup>.

In addition to FAP, juvenile polyposis and Peutz-Jeghers syndrome can also cause stomach polyposis and GC<sup>[11,21]</sup>.

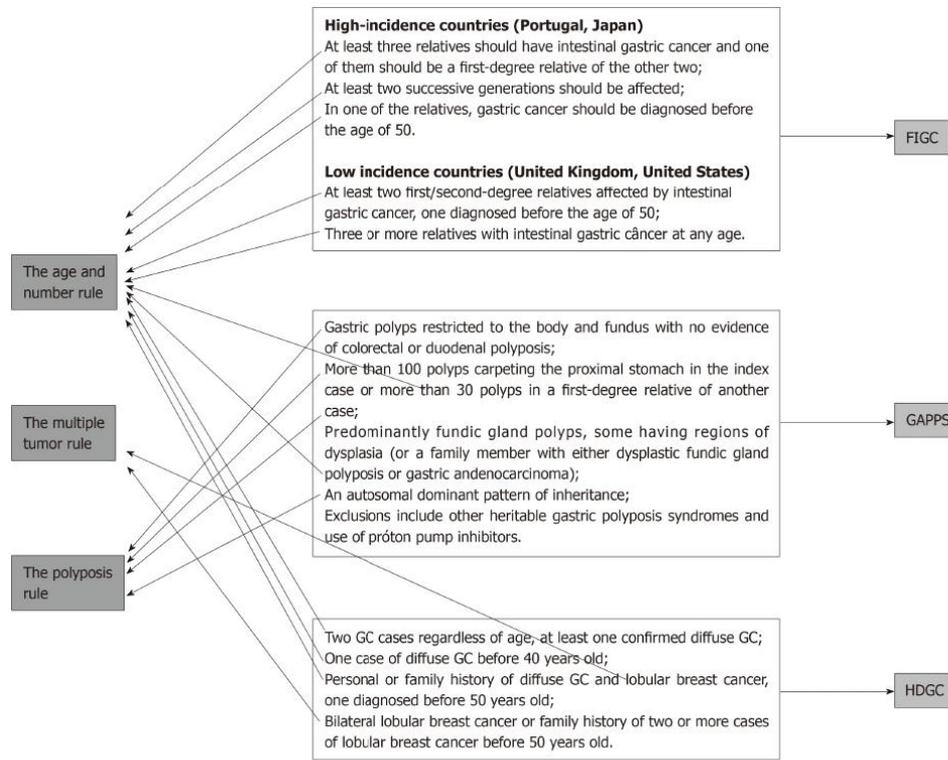
In the case of GC and polyposis, a specialized investigation is necessary, and the management will depend on the type of hereditary syndrome, potentially including investigational and therapeutic procedures in other organs, such as the colon and rectum<sup>[11,21]</sup>.

### POSSIBILITIES OF THE MULTIPLE TUMOR RULE

The presence of multiple tumors, both those restricted to the stomach and other primary tumors affecting distant sites, should alert suspicion for HGC. Although second primary cancers can occur regardless of a hereditary cause, this rule should always be applied to allow rare hereditary cancer discovery<sup>[11,22]</sup>.

### GASTRIC + GASTRIC

A patient with two or more synchronous GC tumors may be affected by HGC. Multiple diffuse GCs are frequently found in diffuse hereditary gastric cancer syndrome. Even if not caught by rule number 1, a patient with diffuse tumors of signet ring cells, although not fulfilling the formal clinical criteria for this syndrome, must undergo a *CDH1* molecular investigation<sup>[11,22,23]</sup>. The recommendations for management according to the molecular diagnosis must be followed as described above.



**Figure 4** The three-rules strategy, comprising every current clinical criterion. GC: Gastric cancer; FIGC: Familial intestinal gastric cancer; GAPPS: Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of stomach; HDGC: Hereditary diffuse gastric cancer.

Gastric stump cancers following gastrectomy due to GC are usually related to environmental causes, such as Epstein-Barr virus infection and alkaline reflux<sup>[24,25]</sup>. Additionally, the cancer field effect plays a role in this situation, since previous exposure to carcinogenic insults might have caused previous driver mutations in the remaining mucosa, which favor posterior development of a second primary tumor. Nevertheless, diffuse histology enhances suspiciousness for HDGC<sup>[26-28]</sup>.

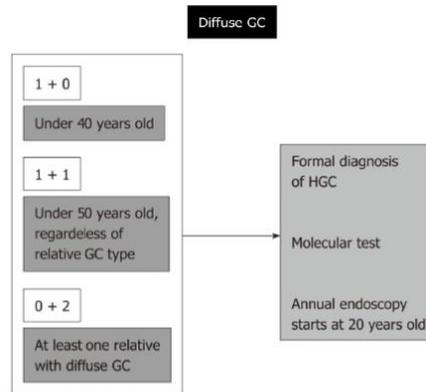
## GASTRIC + BREAST

The association of diffuse gastric cancer and lobular breast cancer is enough to secure an HDGC clinical diagnosis and requires molecular *CDH1* investigation and additional investigational and therapeutic measures, as discussed. In addition to the already cited procedures, possible prophylactic bilateral mastectomy, according to genetic counsel, and mandatory annual breast MRIs are also recommended<sup>[17,27,29]</sup>.

Typical breast cancer syndromes, in addition to bringing a high risk for breast and ovarian cancer, also carry GC risk, and those associations require specialized management<sup>[17,30]</sup>.

## GASTRIC + COLON

Many studies have suggested that HDGC may be associated with colorectal carcinoma (CRC) because this type of cancer has been observed in some HDGC families<sup>[31-33]</sup>. However, despite studies demonstrating the correlation between CRC and the *CDH1* mutation, there is insufficient evidence to propose that the risk of CRC in *CDH1* mutation carriers is significantly elevated, and there are no



**Figure 5** How to diagnose and manage hereditary diffuse gastric cancer by applying rule number 1. The first numbers in white squares refer to early-onset (under 50 years old) cases, and the second numbers refer to the quantity of affected relatives. GC: Gastric cancer; HGC: Hereditary gastric cancer.

recommendations in current clinical practice for CRC screening in *CDH1* mutation carriers<sup>35,37</sup>.

## RARE TUMORS

Although patients with rare tumors do not frequently harbor concomitant HGC, this suspicion should be maintained. Rare tumors usually result from hereditary cancer syndromes; thus, specialized care might be required.

## ADDITIONAL BENEFITS OF THE AGE AND NUMBER RULE BEYOND HGC

Application of rule number 1 may bring additional benefits, favoring the early diagnosis of nonhereditary GCs.

Regarding environmentally caused GC, the environmental cancer-related factors that usually cause sporadic GC are also present in some of the patients' relatives, such as *H. pylori* and alimentary habits<sup>2,6,7</sup>. Since the majority of people exposed to such carcinogens will never develop GC, the affected minority might have a peculiar genetic background, such as specific gene polymorphisms. These polymorphisms are not enough to cause cancer, but in cases of exposure to environmental carcinogens, they favor cancer development<sup>38,39</sup>. The genetic background necessary for the occurrence of sporadic environmental GC includes germline traits shared by most of the patient's relatives. Therefore, investigating the relatives of GC patients caught by rule number 1, even if they do not reach a formal diagnosis of HGC, might result in finding additional sporadic cases or in subsequent fulfillment of the criteria for HGC.

The replicative cause of GC is due to random errors during the replication of stem cell DNA. Since these replicative errors might be more common in cases with an accumulation of DNA polymorphisms in replicative genes, as well as in DNA repair genes, these DNA polymorphisms might result in a major chance for "random" DNA replication errors to affect driver mutations in stem cells<sup>40</sup>.

Accordingly, relatives sharing these genetic backgrounds might be identified by rule number 1.

To provide wide access to the benefits of the three rules, a mobile app is under development and will be available shortly free of charge.

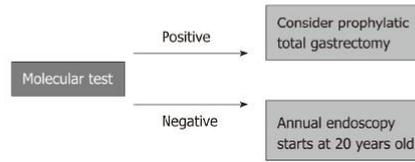
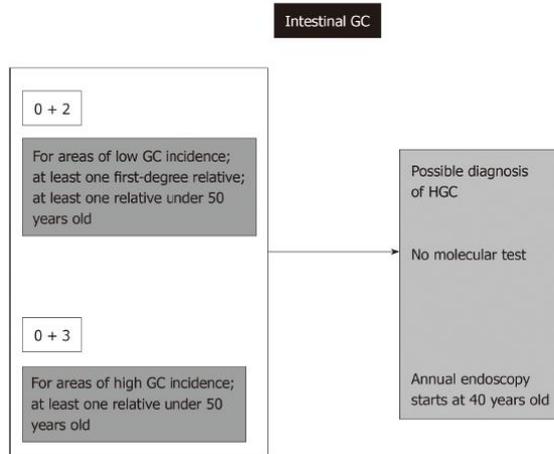


Figure 6 Clinical management of hereditary diffuse gastric cancer syndrome.

---

## CONCLUSION

Although there is potential for discovering GC at early stages among relatives of patients affected by HGC, this possibility is mostly underexplored due to the low suspicion of HGC syndromes. A significant increase in HGC diagnosis may be achieved by applying simple rules for HGC diagnosis triage that are accessible to nonspecialized health-care professionals both in nations with high and low incidence of gastric cancer.



**Figure 7** How to diagnose and manage familial intestinal gastric cancer by applying rule number 1. GC: Gastric cancer; HGC: Hereditary gastric cancer.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge Universidade Federal do Pará (PROPESP and Fadesp) for technical support and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for fellowship support.

## REFERENCES

- Tomasetti C, Li L, Vogelstein B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science* 2017; **355**: 1330-1334 [PMID: 28336671 DOI: 10.1126/science.aaf9011]
- Yusefi AR, Bagheri Lankarani K, Bastani P, Radinmanesh M, Kavosi Z. Risk Factors for Gastric Cancer: A Systematic Review. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018; **19**: 591-603 [PMID: 29579788 DOI: 10.22034/APJCP.2018.19.3.591]
- Petrovchich I, Ford JM. Genetic predisposition to gastric cancer. *Semin Oncol* 2016; **43**: 554-559 [PMID: 27899187 DOI: 10.1053/j.seminoncol.2016.08.006]
- Shi J, Qu YP, Hou P. Pathogenetic mechanisms in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2014; **20**: 13804-13819 [PMID: 25320518 DOI: 10.3748/wjg.v20.i38.13804]
- de Assumpção PP, Araújo TMT, de Assumpção PB, Barra WF, Khayat AS, Assumpção CB, Ishak G, Nunes DN, Dias-Neto E, Coelho LGV. Suicide journey of *H. pylori* through gastric carcinogenesis: the role of non-*H. pylori* microbiome and potential consequences for clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019; **38**: 1591-1597 [PMID: 31114971 DOI: 10.1007/s10096-019-03564-5]
- Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, Offerhaus GJA, Maciejewski R, Polkowski WP. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag Res* 2018; **10**: 239-248 [PMID: 29445300 DOI: 10.2147/CMAR.S149619]
- Tsukamoto T, Nakagawa M, Kiriyama Y, Toyoda T, Cao X. Prevention of Gastric Cancer: Eradication of *Helicobacter Pylori* and Beyond. *Int J Mol Sci* 2017; **18**: pii: E1699 [PMID: 28771198 DOI: 10.3390/ijms18081699]
- van der Post RS, Oliveira C, Guilford P, Carneiro F. Hereditary gastric cancer: what's new? Update 2013-2018. *Fam Cancer* 2019; **18**: 363-367 [PMID: 30989426 DOI: 10.1007/s10689-019-00127-7]
- Boland CR, Yurgelun MB. Historical Perspective on Familial Gastric Cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2017; **3**: 192-200 [PMID: 28275686 DOI: 10.1016/j.jcmgh.2016.12.003]
- Syngal S, Brand RE, Church JM, Giardiello FM, Hampel HL, Burt RW, American College of Gastroenterology. ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol* 2015; **110**: 223-62; quiz 263 [PMID: 25645574 DOI: 10.1038/ajg.2014.435]
- Setia N, Clark JW, Duda DG, Hong TS, Kwak EL, Mullen JT, Lauwers GY. Familial Gastric Cancers. *Oncologist* 2015; **20**: 1365-1377 [PMID: 26424758 DOI: 10.1634/theoncologist.2015-0205]
- Chun N, Ford JM. Genetic testing by cancer site: stomach. *Cancer J* 2012; **18**: 355-363 [PMID: 22846738 DOI: 10.1097/PPO.0b013e31826246dc]
- Vangala DB, Cauchin E, Balmaña J, Wyrwicz L, van Cutsem E, Güller U, Castells A, Carneiro F, Hammel P, Ducreux M, van Laethem JL, Matsiyak-Budnik T, Schmiegel W. Screening and surveillance in hereditary gastrointestinal cancers: Recommendations from the European Society of Digestive Oncology (ESDO) expert discussion at the 20th European Society for Medical Oncology (ESMO) World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, June 2018. *Eur J Cancer* 2018; **104**: 91-103 [PMID: 30342310 DOI: 10.1016/j.ejca.2018.09.004]
- Polom K, Marrelli D, D'Ignazio A, Roviello F. Hereditary diffuse gastric cancer: how to look for and how to manage it. *Updates Surg* 2018; **70**: 161-166 [PMID: 29869323 DOI: 10.1007/s13304-018-0545-1]

- 15 **Kluijt I**, Sijmons RH, Hoogerbrugge N, Plukker JT, de Jong D, van Krieken JH, van Hillegersberg R, Ligtenberg M, Bleiker E, Cats A; Dutch Working Group on Hereditary Gastric Cancer. Familial gastric cancer: guidelines for diagnosis, treatment and periodic surveillance. *Fam Cancer* 2012; **11**: 363-369 [PMID: 22388873 DOI: 10.1007/s10689-012-9521-y]
- 16 **Oliveira C**, Pinheiro H, Figueiredo J, Seruca R, Carneiro F. Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *Lancet Oncol* 2015; **16**: e60-e70 [PMID: 25638682 DOI: 10.1016/S1470-2045(14)71016-2]
- 17 **Kaurah P**, Huntsman DG. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LH, Stephens K, Amemiya A, editors. Hereditary Diffuse Gastric Cancer. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019 [PMID: 20301318]
- 18 **Rudloff U**. Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach: diagnosis and clinical perspectives. *Clin Exp Gastroenterol* 2018; **11**: 447-459 [PMID: 30584346 DOI: 10.2147/CEG.S163227]
- 19 **Mitsui Y**, Yokoyama R, Fujimoto S, Kagenoto K, Kitamura S, Okamoto K, Muguruma N, Bando Y, Eguchi H, Okazaki Y, Ishida H, Takayama T. First report of an Asian family with gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS) revealed with the germline mutation of the APC exon 1B promoter region. *Gastric Cancer* 2018; **21**: 1058-1063 [PMID: 29968043 DOI: 10.1007/s10120-018-0855-5]
- 20 **Beer A**, Streubel B, Asari R, Dejaco C, Oberhuber G. Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS) - a rare recently described gastric polyposis syndrome - report of a case. *Z Gastroenterol* 2017; **55**: 1131-1134 [PMID: 29141268 DOI: 10.1055/s-0043-117182]
- 21 **Islam RS**, Patel NC, Lam-Himlin D, Nguyen CC. Gastric polyps: a review of clinical, endoscopic, and histopathologic features and management decisions. *Gastroenterol Hepatol (NY)* 2013; **9**: 640-651 [PMID: 24764778]
- 22 **Cybulski C**, Nazarali S, Narod SA. Multiple primary cancers as a guide to heritability. *Int J Cancer* 2014; **135**: 1756-1763 [PMID: 24945890 DOI: 10.1002/ijc.28988]
- 23 **Luo W**, Fedda F, Lynch P, Tan D. CDH1 Gene and Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: Molecular and Histological Alterations and Implications for Diagnosis And Treatment. *Front Pharmacol* 2018; **9**: 1421 [PMID: 30568591 DOI: 10.3389/fphar.2018.01421]
- 24 **Rawla P**, Barsouk A. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Prz Gastroenterol* 2019; **14**: 26-38 [PMID: 30944675 DOI: 10.5114/pg.2018.80001]
- 25 **Diogo Filho A**, Botelho LF, Nishiyama A, Zumpano LE, Monte RC, Rosa SC. Gastric stump cancer after gastrectomy by gastroduodenal peptic ulcer. *Arq Bras Cir Dig* 2016; **29**: 65 [PMID: 27120745 DOI: 10.1590/0102-6720201600010017]
- 26 **Assumpção MB**, Moreira FC, Hamoy IG, Magalhães L, Vidal A, Pereira A, Burbano R, Khayat A, Silva A, Santos S, Demachki S, Ribeiro-Dos-Santos A, Assumpção P. High-Throughput mRNA Sequencing Reveals a Field Effect in Gastric Cancer and Suggests an Epigenetic Network Mechanism. *Bioinform Biol Insights* 2015; **9**: 111-117 [PMID: 26244015 DOI: 10.4137/BBIS24066]
- 27 **Tan RY**, Ngeow J. Hereditary diffuse gastric cancer: What the clinician should know. *World J Gastrointest Oncol* 2015; **7**: 153-160 [PMID: 26380059 DOI: 10.4251/wjgo.v7.i9.153]
- 28 **Dotto GP**. Multifocal epithelial tumors and field cancerization: stroma as a primary determinant. *J Clin Invest* 2014; **124**: 1446-1453 [PMID: 24691479 DOI: 10.1172/JCI72589]
- 29 **Ford JM**. Hereditary Gastric Cancer: An Update at 15 Years. *JAMA Oncol* 2015; **1**: 16-18 [PMID: 26182297 DOI: 10.1001/jamaoncol.2014.187]
- 30 **Njoroge SW**, Burgess KR, Cobleigh MA, Alnajjar HH, Gattuso P, Usha L. Hereditary diffuse gastric cancer and lynch syndromes in a BRCA1/2 negative breast cancer patient. *Breast Cancer Res Treat* 2017; **166**: 315-319 [PMID: 28702897 DOI: 10.1007/s10549-017-4393-3]
- 31 **Lo W**, Zhu B, Sabesan A, Wu HH, Powers A, Sorber RA, Ravichandran S, Chen J, McDuffie LA, Quadri HS, Beane JD, Calzone K, Miettinen MM, Hewitt SM, Koh C, Heller T, Wacholder S, Rudloff U. Associations of CDH1 germline variant location and cancer phenotype in families with hereditary diffuse gastric cancer (HDGC). *J Med Genet* 2019; **56**: 370-379 [PMID: 30745422 DOI: 10.1136/jmedgenet-2018-105361]
- 32 **Hamilton LE**, Jones K, Church N, Medicott S. Synchronous appendiceal and intramucosal gastric signet ring cell carcinomas in an individual with CDH1-associated hereditary diffuse gastric carcinoma: a case report of a novel association and review of the literature. *BMC Gastroenterol* 2013; **13**: 114 [PMID: 23849133 DOI: 10.1186/1471-230X-13-114]
- 33 **Brooks-Wilson AR**, Kaurah P, Suriano G, Leach S, Senz J, Grehan N, Butterfield YS, Jeyes J, Schinas J, Bacani J, Kelsey M, Ferreira P, MacGillivray B, MacLeod P, Micek M, Ford J, Foulkes W, Australie K, Greenberg C, LaPointe M, Gilpin C, Nikkel S, Gilchrist D, Hughes R, Jackson CE, Monaghan KG, Oliveira MJ, Seruca R, Gallinger S, Caldas C, Huntsman D. Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *J Med Genet* 2004; **41**: 508-517 [PMID: 15235021 DOI: 10.1136/jmg.2004.018275]
- 34 **Oliveira C**, Bordin MC, Grehan N, Huntsman D, Suriano G, Machado JC, Kiviluoto T, Aaltonen L, Jackson CE, Seruca R, Caldas C. Screening E-cadherin in gastric cancer families reveals germline mutations only in hereditary diffuse gastric cancer kindred. *Hum Mutat* 2002; **19**: 510-517 [PMID: 11968083 DOI: 10.1002/humu.10068]
- 35 **Pharoah PD**, Guilford P, Caldas C; International Gastric Cancer Linkage Consortium. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology* 2001; **121**: 1348-1353 [PMID: 11729114 DOI: 10.1053/gast.2001.29611]
- 36 **Salahshor S**, Hou H, Diep CB, Loukola A, Zhang H, Liu T, Chen J, Iselius L, Rubio C, Lothe RA, Aaltonen L, Sun XF, Lindmark G, Lindblom A. A germline E-cadherin mutation in a family with gastric and colon cancer. *Int J Mol Med* 2001; **8**: 439-443 [PMID: 11562785 DOI: 10.3892/ijmm.8.4.439]
- 37 **Figueiredo J**, Melo S, Carneiro P, Moreira AM, Fernandes MS, Ribeiro AS, Guilford P, Paredes J, Seruca R. Clinical spectrum and pleiotropic nature of CDH1 germline mutations. *J Med Genet* 2019; **56**: 199-208 [PMID: 30661051 DOI: 10.1136/jmedgenet-2018-105807]
- 38 **Cai M**, Dai S, Chen W, Xia C, Lu L, Dai S, Qi J, Wang M, Wang M, Zhou L, Lei F, Zuo T, Zeng H, Zhao X. Environmental factors, seven GWAS-identified susceptibility loci, and risk of gastric cancer and its precursors in a Chinese population. *Cancer Med* 2017; **6**: 708-720 [PMID: 28220687 DOI: 10.1002/cam4.1038]
- 39 **Peng Q**, Chen Z, Lu Y, Lao X, Mo C, Li R, Qin X, Li S. Current evidences on XPC polymorphisms and gastric cancer susceptibility: a meta-analysis. *Diagn Pathol* 2014; **9**: 96 [PMID: 24886180 DOI: 10.1186/1746-1596-9-96]

- 40 **Tomasetti C, Vogelstein B.** Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* 2015; **347**: 78-81 [PMID: 25554788 DOI: 10.1126/science.1260825]

## 6. CAPÍTULO 3. INCIDENCE OF HEREDITARY GASTRIC CANCER MAY BE MUCH HIGHER THAN REPORTED

Artigo submetido à revista científica *Cancers*, atualmente apresenta status “sob revisão”.

Manuscript ID	<b>cancers-2074780</b>
Status	Under review
Article type	Article
Title	Incidence of Hereditary Gastric Cancer May be Much Higher Than Reported
Journal	<i>Cancers</i>
Section	Cancer Epidemiology and Prevention
Special Issue	Feature Paper in Section “Cancer Epidemiology and Prevention” in 2022–2023
Abstract	<p>Hereditary gastric cancers (HGC) are supposed to be very rare and tricky to identify. Nevertheless, many cases of young patients with gastric cancer (GC) fulfill the clinical criteria for considering this diagnosis but do not present the defined pathogenic mutations necessary to achieve a formal diagnosis of HGC. Moreover, GC affecting young people is a challenging medical situation due to the usual aggressiveness of such cases and the potential risk for their relatives in case of being related to a germline variant. Aiming to identify additional germline alterations that might contribute to the early onset of GC, a complete exome sequence of blood samples from 95 GC patients under 50 and 94 from non-cancer patients was performed and compared. The number of identified germline mutations in GC patients was much higher than that from individuals without a cancer diagnosis. Mainly, the number of high functional impact mutations, including those affecting genes involved in medical diseases, those in cancer hallmarks genes, and DNA replication and repair processes, were much higher, strengthening the hypothesis of the potential causal role of such mutations in hereditary cancers. Conversely, the classically related HGC mutations were not found, and neither the number of mutations in genes in the CDH1 pathway was relevant among these so young GC patients, reinforcing the hypothesis of existing alternative germline contributions favoring the early onset of GC. The LILRA2 gene variants, absent in the world’s cancer datasets but present in high frequencies among these GC patients, may represent essential cancer variants peculiar to the Amerindian ancestry’s contribution. Identifying non-reported GC variants, potentially originating from under-studied populations, may pave the way for additional discoveries and translations to clinical interventions helping GC management. The proposed new approaches may reduce the discrepancy between clinically suspected and molecularly proven hereditary GC and shed light on similar inconsistencies among other cancer types. Additionally, it may support the development of new blood tests for evaluating cancer risk, to be translated to clinical practice, helping physicians make decisions about strategies for surveillance and risk reduction interventions.</p>

## **Incidence of Hereditary Gastric Cancer May be Much Higher Than Reported**

Hereditary gastric cancers (HGC) are supposed to be very rare and tricky to identify. Nevertheless, there are many cases of young patients with gastric cancer (GC) and many families with multiple cases of GC (Ugai et al., 2022). These situations are very suggestive of being related to the genetic background since most sporadic GC affects older patients and does not present familial aggregations (van der Post et al., 2019; Oliveira et al., 2015).

Reaching a molecular diagnosis of HGC is an arduous task, even in referential cancer centers able to perform every type of molecular investigation. Most clinically considered cases fail to achieve the expected requirements to affirm a molecular diagnosis, regardless of being diagnosed as potential cases of HGC (Assumpção et al., 2020).

The consequences of such disparities come to clinical practice. Many physicians feel insecure about managing such patients concerning performing screening procedures that might contribute to potential early diagnosis among patients' relatives but, conversely, may result in stress and anxiety for them, in addition to being expensive and invasive. Another critical issue is that a late diagnosis in such cases could even cause embracement for these physicians and damage to the patients (Polom et al., 2018; Blair et al., 2020).

Regardless of exponential increases in medical genetic knowledge and technical developments, many questions still need to be solved to improve the diagnosis of HGC (Yeoh and Tan, 2021). Hereditary driver mutations constitute the rarest type of driver mutations and, per se, are usually not enough to cause cancer since having every necessary mutation for an adult cancer occurrence already presented at birth's onset seems to be inconceivable (Porta-Pardo et al., 2020; Tomasetti et al., 2017).

Conversely, starting the cancer process with driver mutations might bring an advantage, possibly anticipating cancer onset in many years (Kentsis, 2020). If confirmed, this hypothesis could explain why most hereditary cancer cases occur among younger people, compared to non-hereditary ones.

Undoubtedly, more is needed to explain diverse clinical situations, including the cases where a germline contribution is strongly supposed but not recognized, according to the current rules

(Blair et al., 2020). That is the case of young gastric cancer patients without CDH1 germline cancer causal mutations, nor other rare ones, such as those in the CTNN1A gene, supposed to favor GC onset strongly (Shenoy, 2019; Clark et al., 2020; Hansford et al., 2015).

Many potential clinical cases of HGC seem not to harbor a pathogenic germline mutation. Nevertheless, germline mutations, including functional ones, in essential cancer-related genes are found by exome sequencing of these patients, even though these are not recognized as causal events for hereditary gastric cancer (Donner et al., 2015; Pocrull et al., 2021).

Aiming to explore potential germline contributions to HGC, and even for other hereditary cancer types, we proposed a strategy consisting of searching for germline mutations affecting potential cancer-related genes and not limited to the already established HCG-causing genes.

Additionally, we hypothesized that the global germline mutation burden and specific germline mutation burdens, such as those in DNA repair genes or genes involved in the DNA replication process, among others, described in detail in the methods session, might impact the risk for HCG.

This research strategy also takes advantage of investigating under-studied populations from the Amazonia since the scarcity of sequencing of Amerindians' genomes might represent a window of opportunities for discovering new germline variants involved in GC risk.

## Methods

The study was approved by the National Research Ethics Committee (CONEP; available at: <http://conselho.saude.gov.br/comissoes-cns/conep/>; accessed on 13 January 2022) and by the Research Ethics Committee of the Federal University of Pará (CAE: 20654313.6.0000.5172). All individuals and community leaders signed an informed consent form (TCLE). The research followed relevant guidelines/regulations, and all participants read and signed the written informed consent.

Ninety-five patients with histopathological diagnosis of gastric adenocarcinoma established under 50 years old were included. Patients who submitted to curative intended gastrectomy and had a peripheral blood sample collected before any therapeutic modality were selected for the analysis. Those with a previous or concomitant diagnosis of other cancers, inadequate sample quality for sequencing, or inaccessibility of data in the clinical records were excluded.

The clinical and pathological data of the patients are presented in Supplementary Table 1.

A non-cancer control group of 94 Amerindians from the Brazilian Amazonia was also included. The senior author (Santos, S.E.) provided data from this group that's available at the European Nucleotide Archive database (ENA <https://www.ebi.ac.uk/ena>) under the accession number PRJEB35045.

The same lab protocols were applied for every step of the analyses of both groups.

#### Extraction of the DNA and Preparation of the Exome Library

DNA was extracted from a peripheral blood sample using the phenol-chloroform method described by (M.R. and J., 2012). The Nanodrop-8000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA) was used to quantify the genetic material. Its integrity was evaluated by 2% agarose gel electrophoresis.

Libraries were prepared using the Nextera Rapid Capture Exome (Illumina®, San Diego, CA, USA) and SureSelect Human All Exon V6 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) kits, following the manufacturer's recommendations. The sequencing reactions were performed on the NextSeq 500® platform (Illumina®, San Diego, CA, USA) using the NextSeq 500 High-output v2 Kit 300 cycle kit (Illumina®, San Diego, CA, USA).

#### Bioinformatic Analysis

Reads in FASTQ format were analyzed for quality (FastQC v.0.11 <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) and filtered to eliminate low-quality reads (fastx\_tools v.0.13 [http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)). Then, the sequences were aligned to the reference genome (GRCh38) using the BWA v.0.7 tool (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>).

After alignment, the generated file was indexed and sorted (SAMtools v.1.2—<http://sourceforge.net/projects/samtools/>). Subsequently, the alignment was processed to remove duplicate readings (Picard Tools v.1.129—<http://broadinstitute.github.io/picard/>),

mapping quality recalibration and local realignment (GATK v.3.2—<https://www.broadinstitute.org/gatk/>). Finally, the result was processed in search of variants (GATK v.3.2, United States; <https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>) of the reference genome.

### Statistical Analyses

All graphical and statistical analyzes were performed using the R Studio v.4.2.1 program (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Significant differences in mutation rates were analyzed by the Wilcoxon-Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests. The False Discovery Rate (FDR) was used to correct the multiple analyses. Results were considered statistically significant when the adjusted p-value was less than 0.01 ( $\text{adj.p} \leq 0.01$ ).

The impact and consequences of mutations were described according to SnpEff software, a program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms (Cingolani et al., 2012). SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) and PolyPhen (Kumar et al., 2009) bioinformatics tools predicted the functional effect of missense mutations.

For reporting the number of mutations for each subset of genes described below, only non-synonymous mutations with a high or moderated impact and frequencies under 10% of the world population were considered. Regarding the total germline mutation burden (GMB), every identified mutation was included without applying these filters.

The gene subsets included in the analyses and applied for the group's comparisons were:

**GMB:** The total number of germline mutations.

**GHFI:** The number of non-synonymous mutations presenting high functional impact, according to (Qing et al., 2020a).

**GMed:** The number of non-synonymous mutations presenting high functional impact among genes related to clinical diseases (GMed, included in the same reference. (Qing et al., 2020a)

**GHallmark:** the number of non-synonymous mutations in cancer's hallmarks genes (GCH), according to the list described at (Qing et al., 2020a; Hanahan and Weinberg, 2011).

**GRepRep:** the number of non-synonymous mutations in genes involved in the replication or repair processes (GRepRep), listed in (SF table 2).

**GCDH1path:** the number of germline mutations with high functional impact in genes of CDH1 pathway (KEEG: N258\_257\_61). (Kanehisa and Goto, 1999)

## Results

### Mutations' impacts and consequences

The impacts of the GC patients' mutations and the consequences of the high-impact ones are presented in Figures 1A and 1B. Most mutations were classified as low or moderate. Among the high-impact mutations, the most frequent consequences were frameshift variants.

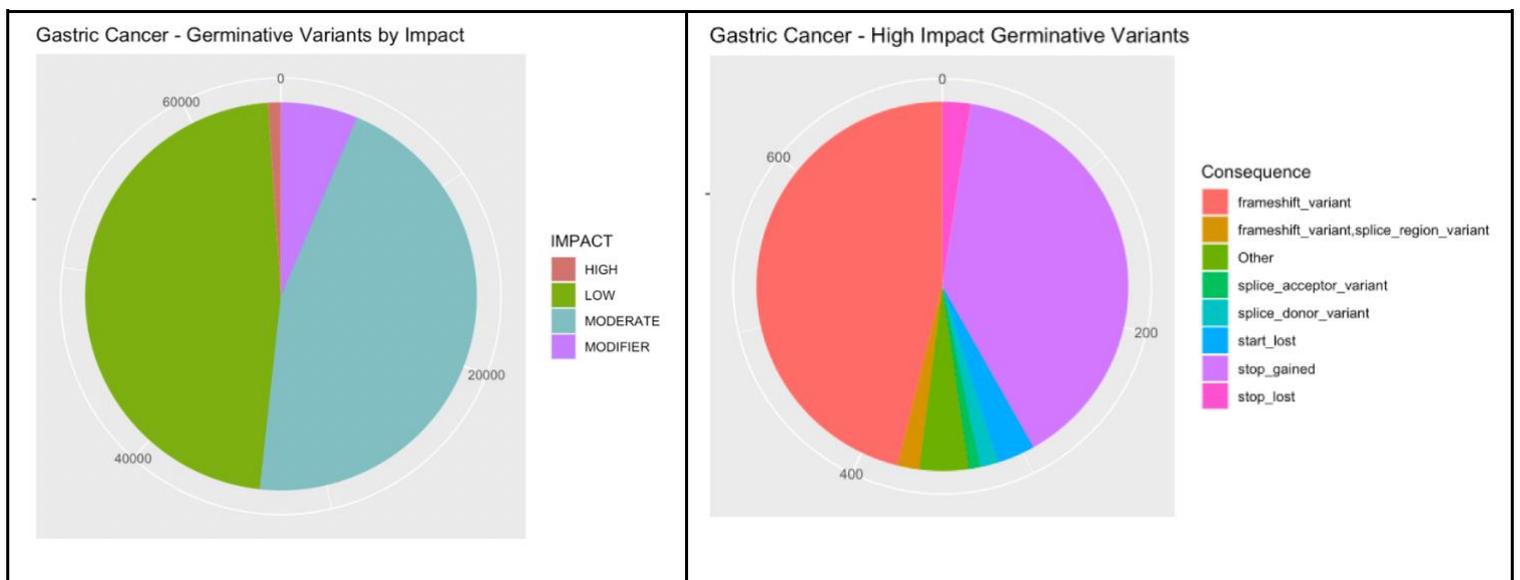


Figure 1: Impact (A) and high impact variants consequence (B).

### Number of mutations

The total number of mutations in both gastric cancer and non-cancer groups and each number of selected mutations in each gene sub-sets are presented and compared in Graphic 2.

A significant adj.p value was reached for GMB, where the total number of mutations in the GC group was much higher than that of the non-cancer group (p.adj.:0.008).

Regarding the selected types of mutations analyzed for each subset of genes, significant differences were found for GFI (p.adj.: 0.000), GMed (p.adj.:0,000), and GHallmark (p.adj.:0.008), with higher numbers of mutations in the GC group.

Considering the GRepRep subset, the GC groups presented much more mutations than the control group; a statistical impact was not reached due to a reduced number of mutations in both groups and the limited number of included samples.

Regarding mutations in the CDH1 gene and genes involved in the CDH1 pathway, a scarcity of mutations in both groups, none of them in the CDH1 gene, was the resulting scenario, as presented in Figure 2

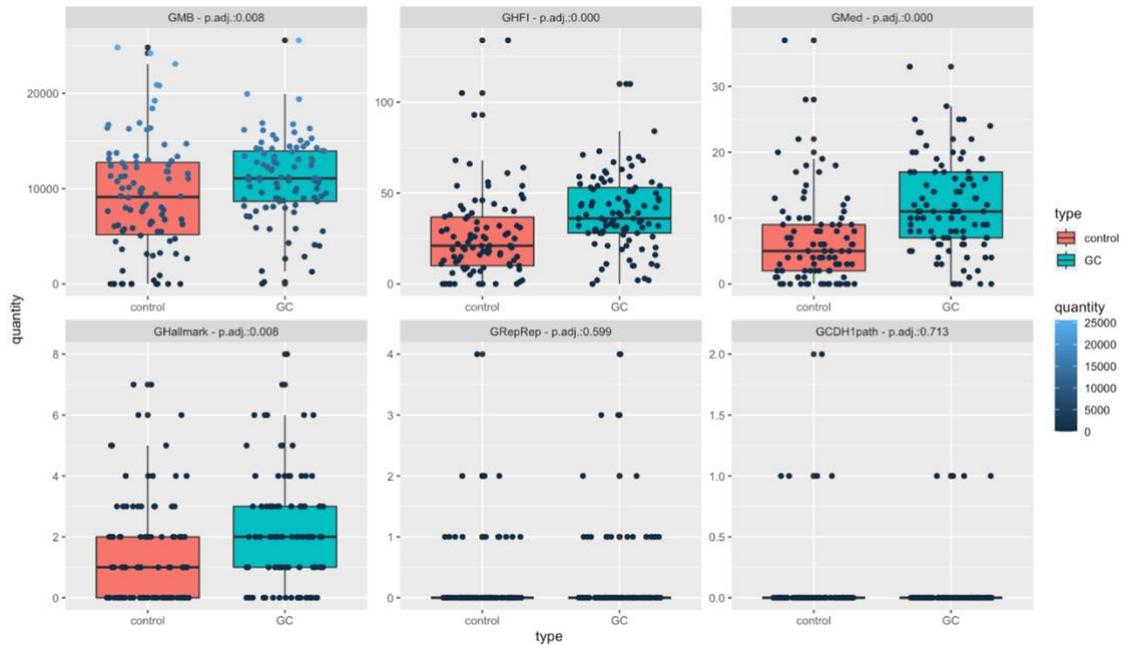


Figure 2: Quantity of mutations in GC and non-cancer groups exposed and compared. There were more mutations in the GC groups, reaching statistical significance for the total number of mutations (GMB) and the gene subsets GHI, GMed, and GHallmark. No statistical differences occurred in the subsets GRepRep nor GCDH1path.

#### 4.4. Most mutated genes and correlations to clinical characteristics

The most frequently mutated genes are presented in the following plots, together with the clinical data and the impact of each mutation, favoring an integrated view of mutations frequencies, distributions, and types and their relationship with clinical features.

The MUC gene families appeared among the most prevalent ones. Regarding high-impact mutations, the LILRB1 gene appears as a promising target to be validated and deeply investigated. The frequencies of these mutations were null in every consulted data bank (GNOMAD, ABraOM, ExAC, UK10K) while presented mutations in 31 cases of GC and 13 non-cancer controls, arising as a putative cancer risk gene for this population.

Note that CDH1 and CTNNA1 genes do not appear in this list. There were no pathogenic variants currently related to HGC in these genes among the almost 70,000 found mutations in this series of 95 young GC patients.

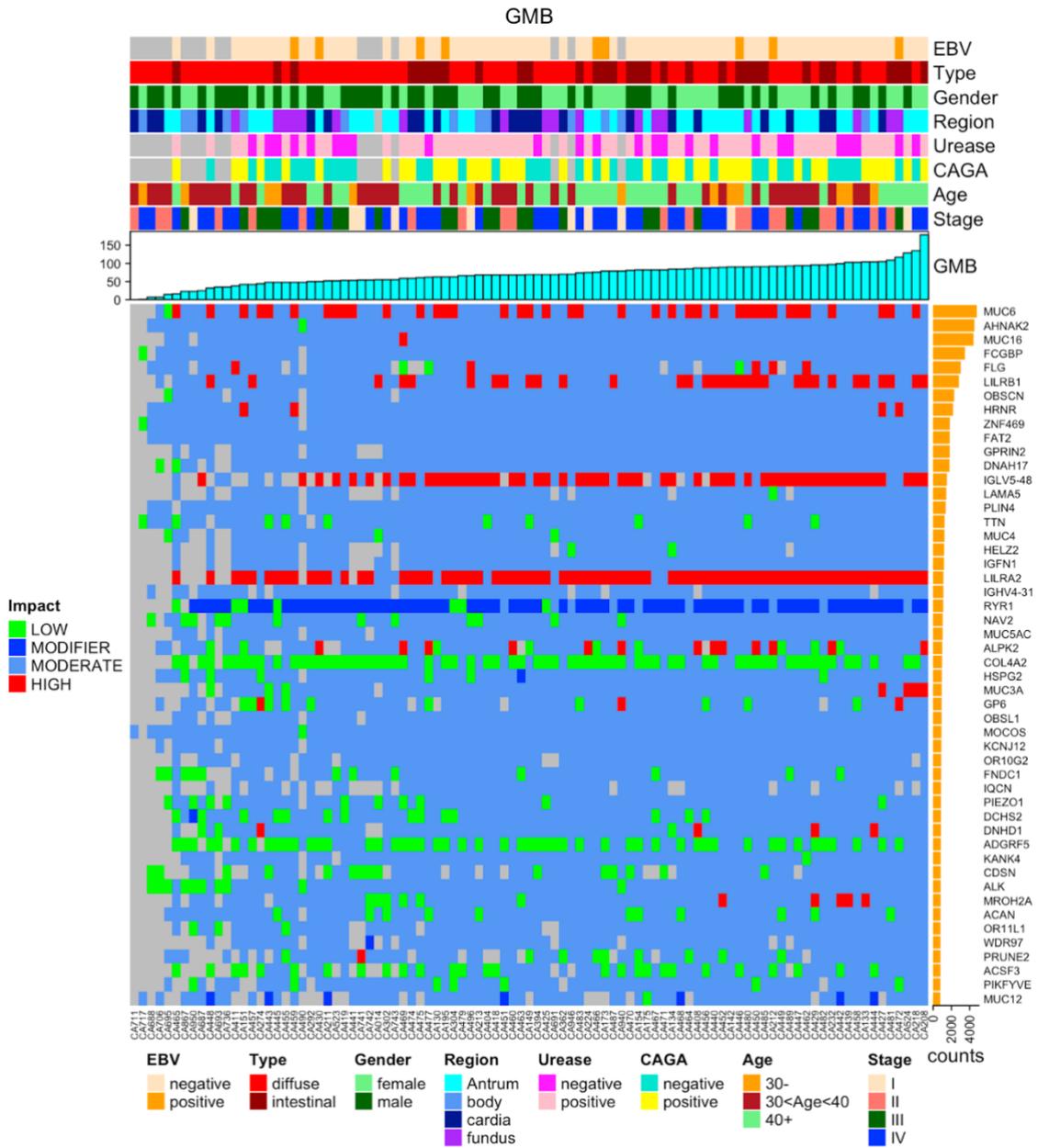


Figure 3: Most mutated genes in the GC group, the clinical data, and the impact of each mutation.

### Most common variants and clinical features

After applying the filters, excluding the less relevant ones, a plot for each reported subset, again in an integrated view with clinical data, is demonstrated regarding the most frequent gene variants in each subset of genes.

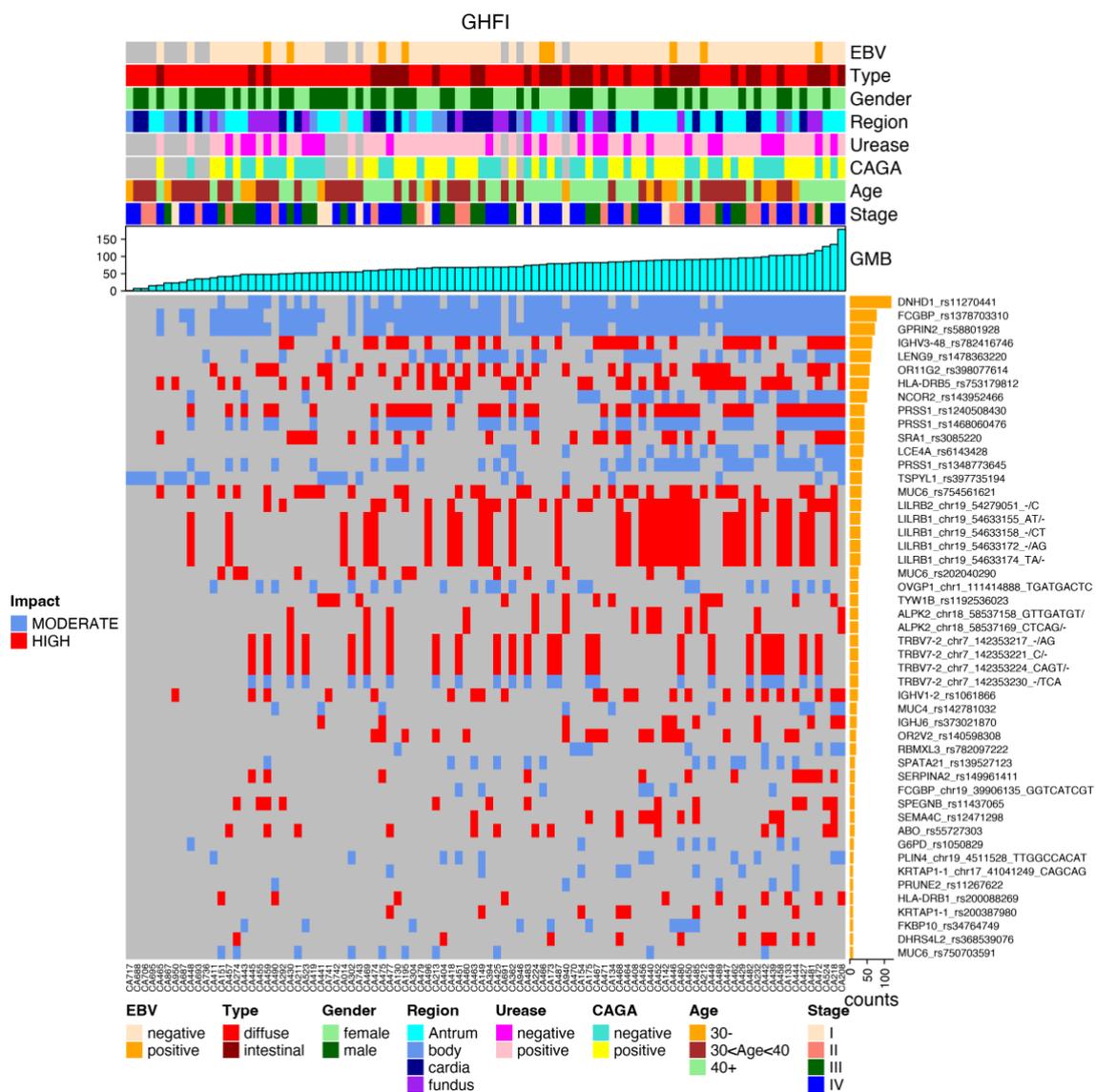


Figure 4: Most prevalent variants in GHFI gene's subset among young patients with gastric cancer and their distribution according to clinical features and mutation impact.

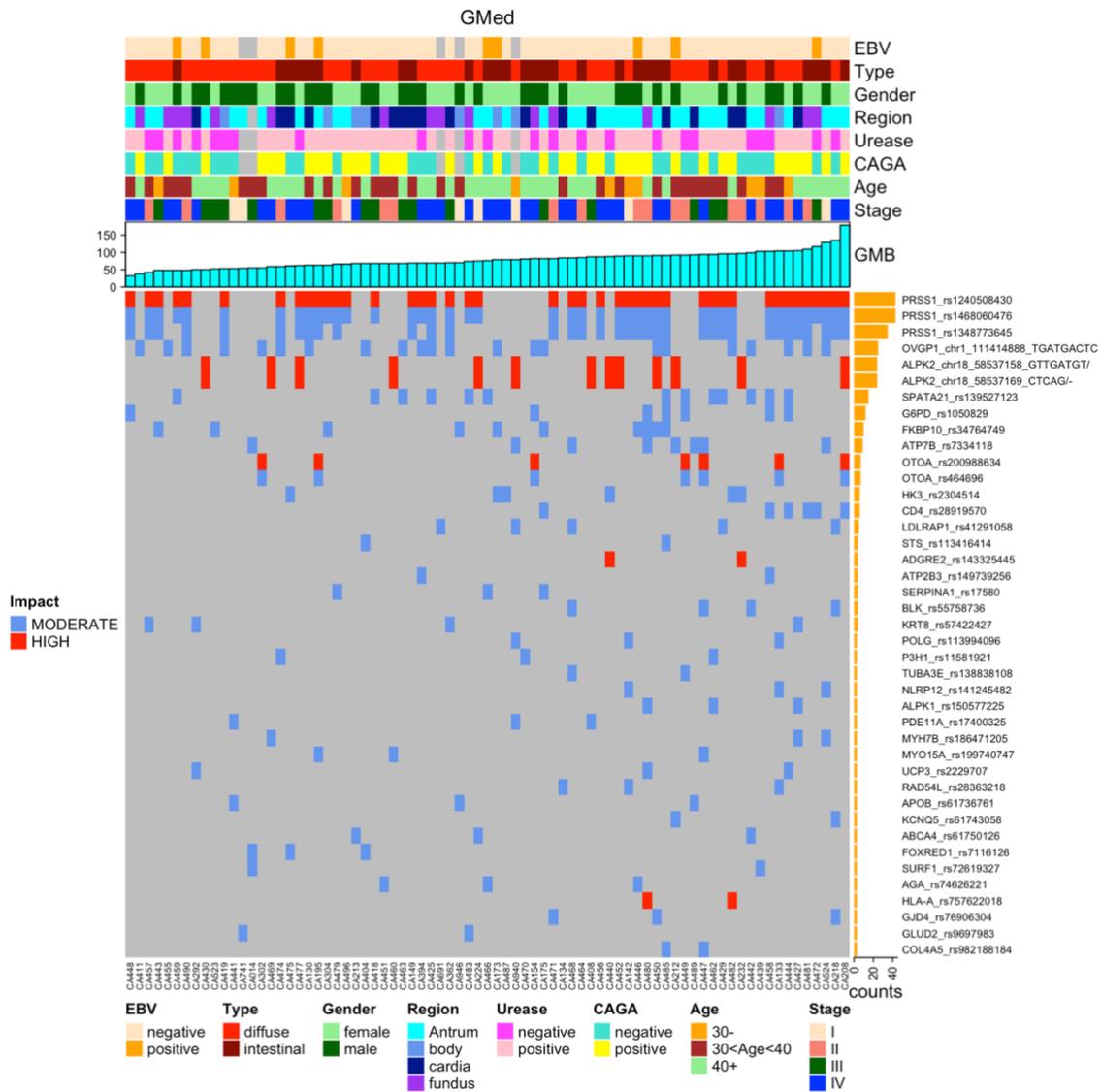


Figure 5: Most prevalent variants in GMed gene's subset among young patients with gastric cancer and their distribution according to clinical features and mutation impact.

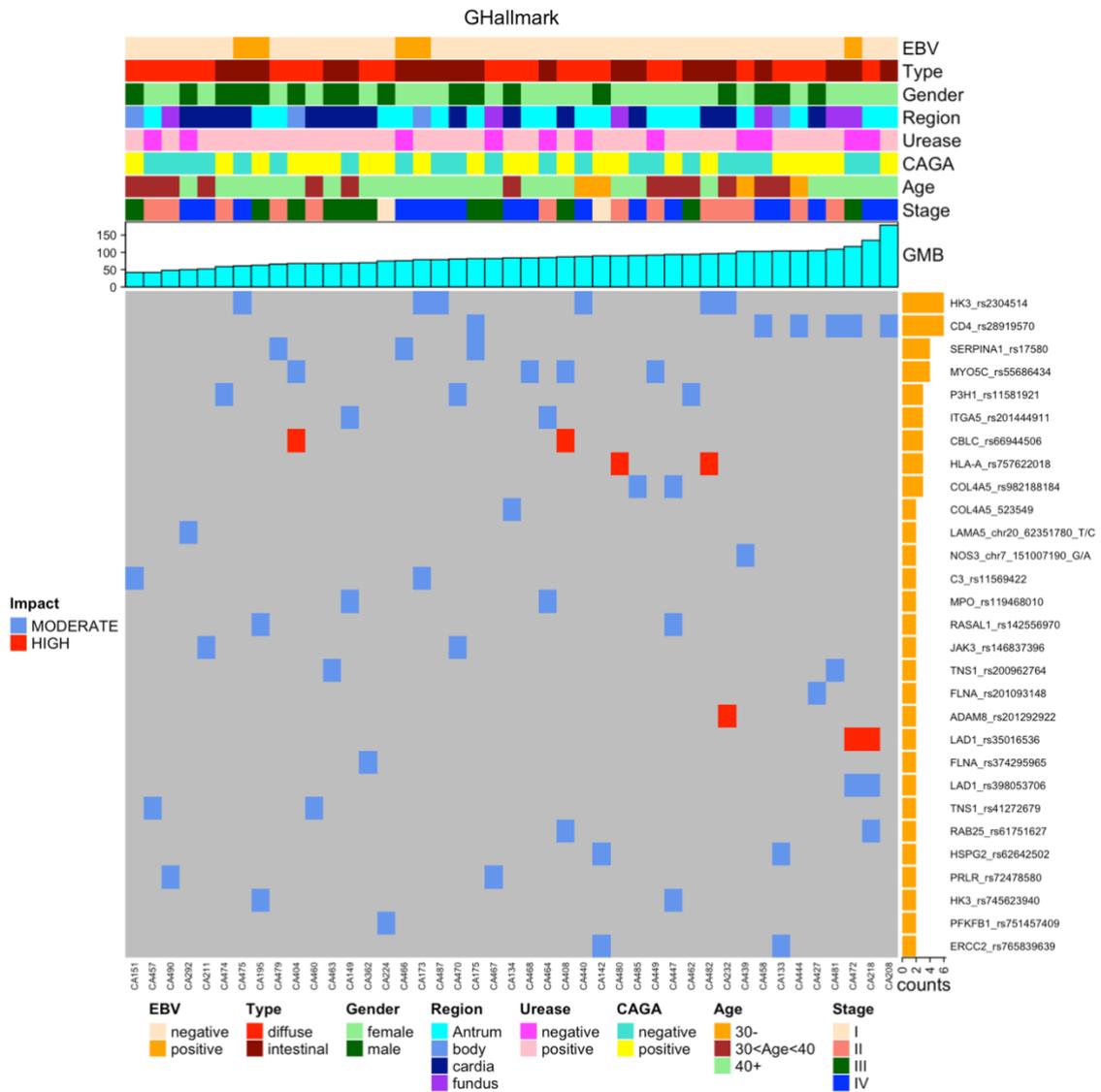


Figure 6: Most prevalent variants in the GHallmark gene's subset among young patients with gastric cancer and their distribution according to clinical features and mutation impact.

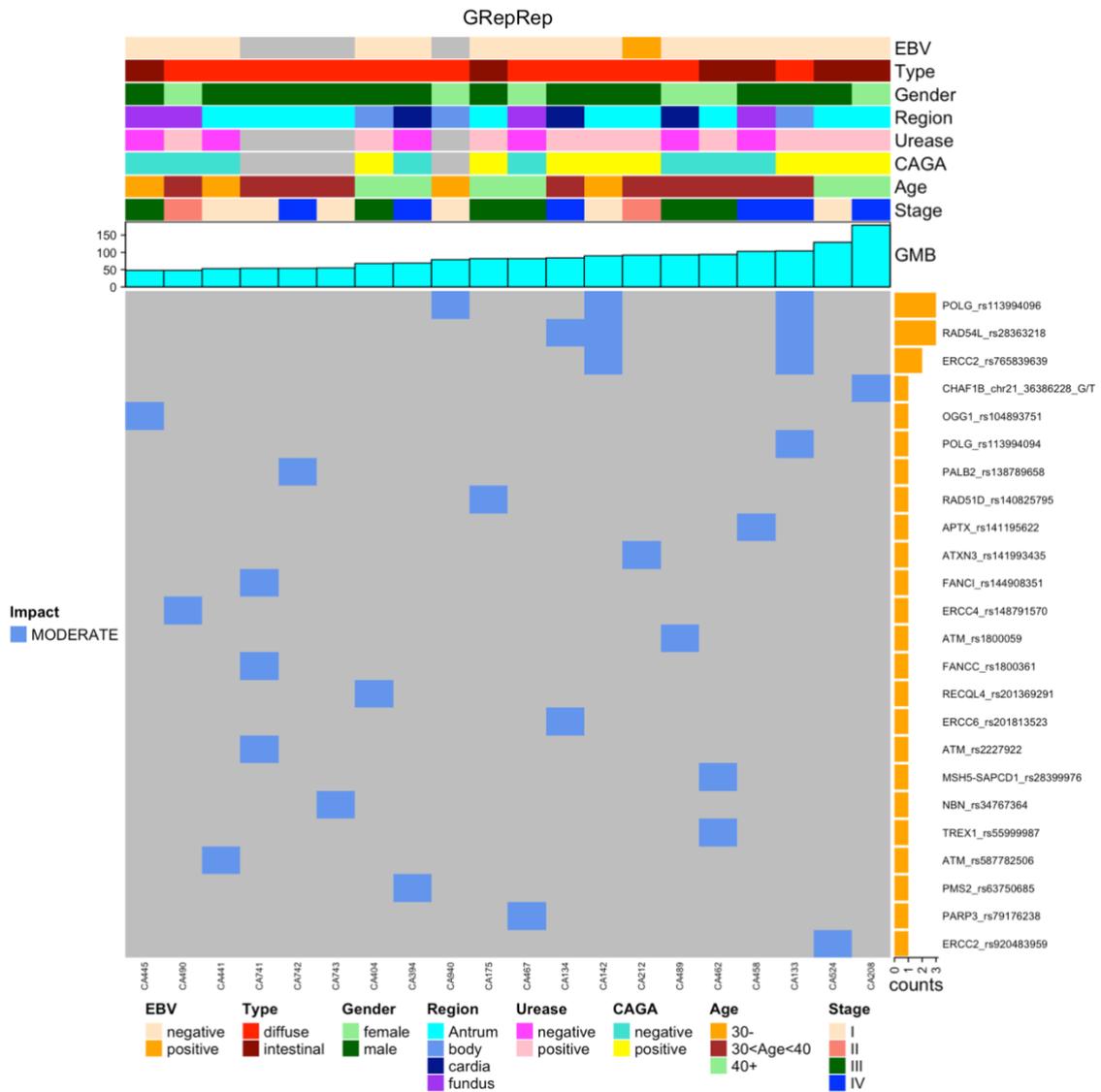


Figure 7: Most prevalent variants in GRepRep gene's subset among young patients with gastric cancer and their distribution according to clinical features and mutation impact.

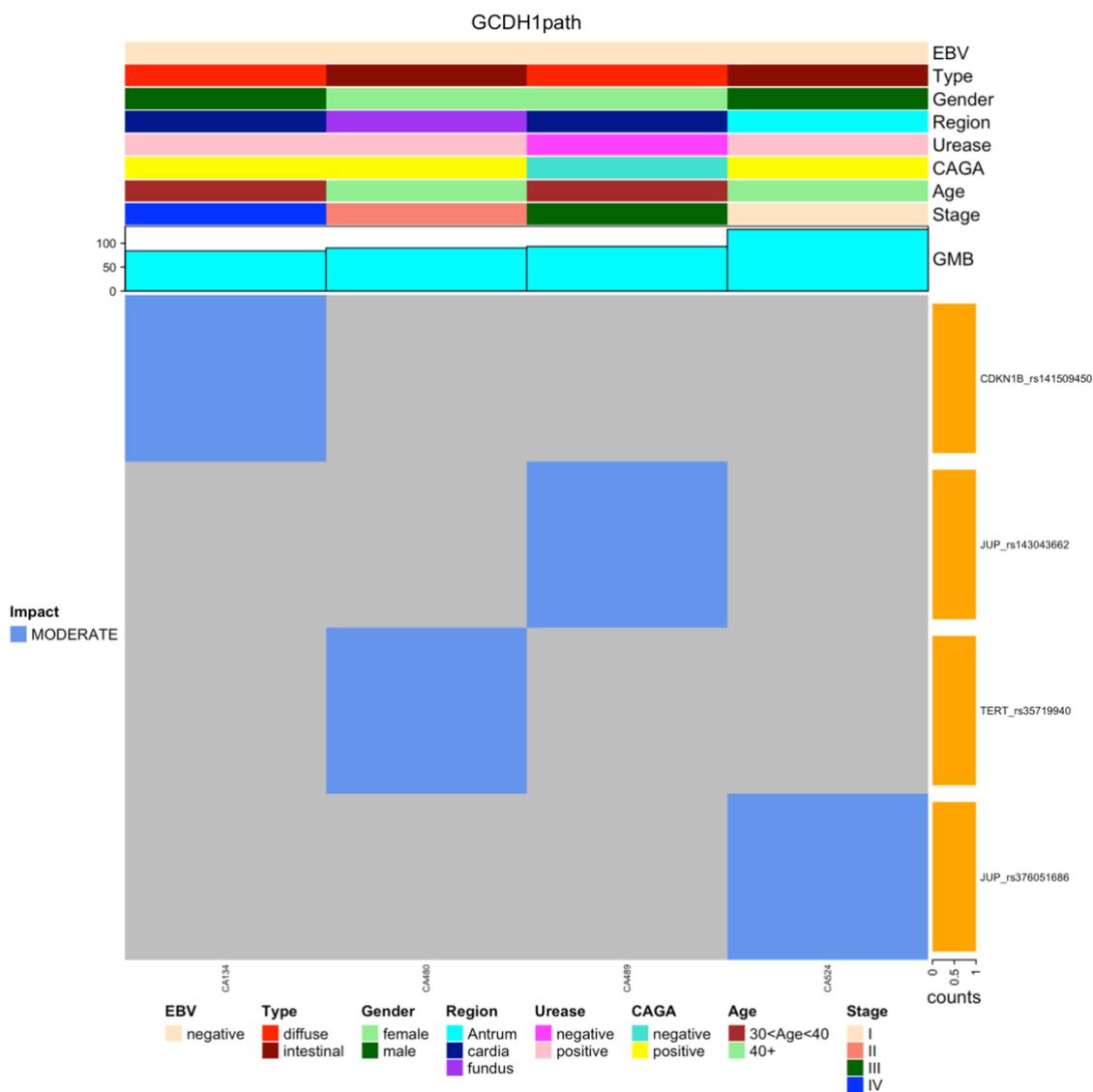


Figure 8: Most prevalent variants in the GCDH1path gene's subset among young patients with gastric cancer and their distribution according to clinical features and mutation impact.

Although not reaching statistical significance, a table presenting the adj.p value for every gene sub-set correlation to each clinical data is presented below.

		<b>GMB</b>	<b>GHFI</b>	<b>GMed</b>	<b>GHallmark</b>	<b>GRepRep</b>	<b>GCDH1path</b>
<b>Gender</b>	padj	0.12640	0.12640	0.47426	0.99146	0.12640	0.99146
<b>H. type</b>	padj	0.01328	0.09556	0.57447	0.10885	0.57447	0.57447
<b>Stage</b>	padj	0.89760	0.8976	0.89760	0.89760	0.03529	0.89760
<b>Age</b>	padj	0.32287	0.44947	0.7559	0.05163	0.51499	0.75590
<b>PCR.urease</b>	padj	0.88930	0.88930	0.88930	0.88930	0.88930	0.88930
<b>CAGA</b>	padj	0.99433	0.99433	0.99433	0.99433	0.99433	0.99433
<b>EBV</b>	padj	0.87695	0.87695	0.90029	0.87695	0.87695	0.87695
<b>Region</b>	padj	0.24500	0.16219	0.24500	0.24500	0.6612	0.66120
<b>EBV_urease</b>	padj	0.93363	0.93363	0.93363	0.93363	0.93363	0.93363
<b>EBV_CAGA</b>	padj	0.99597	0.99597	0.99597	0.99597	0.99597	0.99597

Table 1: Subsets Statistical Analysis by Clinical Data - FDR was used to adjust p-values.

## Discussion

GC affecting young people is a challenging medical situation due to the usual aggressiveness of such cases. There are many tragic consequences, causing severe physical restrictions and even death, of individuals just starting their productive life, constructing their families and histories (Li, 2020; Cheng et al., 2020).

Moreover, the unsafety feelings that affect the patient's relatives and the health care providers impact the quality of life of all involved (Blair et al., 2020; Kumar et al., 2019; Pantelis et al., 2016).

A few molecular germline mutations are currently recognized as causal events related to these cases (Zhang et al., 2018). There are formal recommendations for the carriers and their relatives in these situations. (Cosma et al., 2022). Nevertheless, many young GC patients do not have such mutations, as in these 95 under 50 years old GC patients. Consequently, no specific measures are implemented to identify relatives at risk or look for cancer risk reduction strategies.

Most investigations aiming to identify germline variants implicated in cancer risk are focused on already described genes or variations related to each specific disease or, in the case of non-target exploration, are mainly based on associations of genetic variations and cancer occurrence. Genome-wide association studies (GWAS) are the most robust strategies usually applied to such discoveries (Saeki et al., 2012; Yan et al., 2019; Park et al., 2018).

The main principle of GWAS relies on investigating a large number of cases and controls (thousands) to reliably identify variants more frequently present among cases than among controls as a first step of the strategy (Tam et al., 2019; Scherer and Christensen, 2016). This principle is based on the hypothesis that specific variations implied in genetic cancer risk are recurrently present among the cases and absent among the controls.

Although favoring many vital discoveries in cancers and other diseases, GWAS does not cover all the potential genetic risk factors affecting cancer onset. Looking for recurrent genetic variations peculiar to that investigated cancer may underestimate the importance of some rare genetic variations (Qing et al., 2022).

Every cancer-related mutation that modifies a relevant protein for the cancer process can favor carcinogenesis, even if it rarely occurs. Accordingly, a genetic variant rarely found among the cancer group could escape from being identified as a relevant risk factor for that cancer in the GWAS, and may not be considered "harmful."

Nevertheless, it must be highlighted that cancer occurrence depends on many additional circumstances.

Germline mutations increase the risk of cancer but usually are not enough to cause adult cancers, including GC, without additional somatic mutations affecting the target tissue (Knudson, 1971; Chernoff, 2021).

The related consequences of germline gene mutations for embryonic development phases might be disastrous if stem cells avoid differentiation, increase divisions or permit highly deleterious errors to be transmitted to the daughter stem cells, affecting body development (Vogelstein et al., 2013).

Consequently, most germline cancer mutations occur in only one tumor suppressor gene allele, preserving tissues and organ development. The second hit, a somatic event reaching the normal allele, might finally complete that cancer driver event (Chernoff, 2021).

Even if homozygotes germline mutations occur, the affected gene position, in such a situation, is usually not strong enough to cause cancer. These events are either insufficient to cause the

event or are counteracted by redundant controls or compensatory mechanisms. Nevertheless, they might represent a significant additional risk factor for cancer development (Vogelstein and Kinzler, 2015).

Reported exomes from clinical cases of HGC demonstrated plenty of germline functional mutations in genes not recognized as causal germline GC mutations (Herrera-Pariente et al., 2021; Chen et al., 2018). The results presented by our team are also teeming with conceptually nonrelevant germline events, although affecting relevant cancer genes. These mutations do not require formal procedures or special attention, even though being able to contribute to the cancer risk.

A hypothesis is sustained that patients with inherited mutations in cancer-related genes might have an advantage in the oncogenic process. Accordingly, having more than one germ line functional mutation potentially increases the chance of somatic second-hit events. In other words, starting the cancer ride with many potential targets for a second somatic event might enhance the cancer risk and favor the early onset of cancers.

Additionally, mutations in genes involved in the replication and the DNA repair processes, if present, could favor the accumulation of additional non-repaired mutations, increasing the cancer risk (Shlien et al., 2015).

Moreover, mutations with high functional impact, although not necessarily linked to a specific disease, may also increase the risk for diverse diseases, including cancer (Cui et al., 2019).

There are also genes recognized to be involved in medical diseases that, if mutated, could favor the break of healthy homeostasis, eventually contributing to cancer onset (Landrum et al., 2015).

Farther, genes involved in the cancer hallmarks are hot spots for every cancer investigation, so they were also checked if affecting by germline mutations could increase the cancer risk (Qing et al., 2020b).

Regarding HGC, mainly represented by DHGC, in the absence of CDH1 pathogenic mutations, investigating genes included in the CDH-1 pathway might identify alternative mutations to be explored (Shenoy, 2019; Gall and Frampton, 2013; Wang et al., 2013).

A deep investigation was performed, including the complete exome sequencing of 95 early-onset GC patients under 50 years old and a control group of 94 non-cancer Amerindians. Robust evidence that a higher germline number of mutations seems to be related to a higher risk of GC, as well as mutations in sub-sets of genes carrying functional consequences putatively involved in the cancer processes.

A potential criticism of the proposed hypothesis is whether the reported mutations are germline. Since blood samples were collected in adulthood, some of the found mutations might be somatic blood mutations, not related to the carcinogenic process. Considering this argument, the number of expected mutations should be much higher among older than younger ones since the rate of somatic mutations increases with aging. Additionally, regarding the non-cancer control group, blood samples were similarly collected in adulthood, validating the comparisons (Kraft and Godley, 2020).

Additionally, reporting data from Amerindians and comparing this data with patients carrying part of this genetic ancestry, as reported, may also favor very relevant discoveries. Most reported cancer variants come from data banks lacking Amerindian samples. Accordingly, a variant peculiar to that ancestry might never be reported, regardless of being important for cancer risk (Oak et al., 2020; Ribeiro-Dos-Santos et al., 2020).

That seems to be the case of the LILRB1 gene variants, absent in the world's cancer datasets but present in high frequencies among these GC patients and the Amerindians. These variants, if validated, may represent essential cancer variants peculiar to the Amerindian ancestry's contribution (Oak et al., 2020).

An alternative interpretation might consider these variants related to the population but not to the GC risk. This hypothesis should be true if the variants' frequencies were more common among the Amerindians than among the admixed GC group that carries no more than 30% of

the Amerindian's genetic background. However, it is the contrary since the variants are about three times more common among the GC group.

The proposed hypothesis implies these variants in HGC risk and, if present in the admixed population, increases the risk for GC together with other genetic and environmental risk factors. Although present among the Amerindians, their GC's incidence is unknown. Additionally, they do not seem exposed to many environmental cancer risk factors.

These findings open an avenue to investigate additional variants and, mainly, to consider a low-cost blood test to search for such variants to identify people at risk or even asymptomatic GC patients, favoring earlier diagnosis and better outcomes.

Regarding GRepRep mutations, the GC group also presented a much higher number of relevant mutations than the control group, nevertheless without reaching statistical impact due to the small number of mutations in both groups.

We also demonstrated that a higher number of GRepRep mutations was related to a higher GMB. Nevertheless, a causal relationship cannot be proved by using just these data since the higher number of GRepRep mutations could be only a consequence of the increased GMB (Zhang et al., 2022; Shlien et al., 2015).

Additionally, there are much more mutations in genes with high functional impact, in those related to medical diseases, and in cancer hallmarks genes, among cancer patients than in the non-cancer group. These might also represent a picture of the whole scenario of higher GMB in the cancer group, although representing putative risk factors for developing diseases, including cancer.

Conversely, the number of mutations in the CDH1 pathway is irrelevant, enhancing the hypothesis of existing alternative germline contributions to be explored.

Nevertheless, these relevant findings do not correlate with the clinical data. The small number of cancer patients in each clinical situation may justify these negative results, and that correlation needs to be explored in a more extensive series of cases.

Performing the proposed non-restricted exploration of genetic variants among young patients with GC provided plenty of potential cancer-related variations not previously considered as HGC risk factors. The reported germline mutations must be explored as promising biomarkers of GC risk, opening a new perspective for discovering and translating biomarkers for helping clinical management of these so aggressive neoplasias.

Additionally, if confirmed as germline risk factors for hereditary GC, these new findings may redefine epidemiological data, pushing the number of unrecognized cases of hereditary cancers.

### Conclusions

Currently, the numbers of molecular confirmed HGCs are minimal, in contrast to the number of patients that fulfill the clinical criteria for considering this diagnosis.

Analyses of the germline mutation burden strongly demonstrated that the group of young GC patients presents much more mutations than that of the non-cancer control group, suggesting a role for previously non-valorized germline mutations in HCG risk.

The number of mutations identified by exome sequencing from the blood of early onset GC was much higher than that from individuals without a cancer diagnosis. Mainly, the number of high functional impact mutations, including those affecting genes involved in medical diseases, those in cancer hallmarks genes, and DNA replication and repair processes, were much higher, strengthening the hypothesis of the potential causal role of such mutations in hereditary cancers.

Conversely, the classically related HGC mutations were not found, and neither the number of mutations in genes in the CDH1 pathway was relevant among these so young GC patients, reinforcing the hypothesis of existing alternative germline contributions favoring the early onset of GC.

Identifying non-reported GC variants, potentially originating from under-studied populations, may pave the way for additional discoveries and translation of this knowledge to clinical interventions helping GC management.

The proposed new approaches may reduce the discrepancy between clinically suspected and molecularly proven hereditary GC and shed light on similar inconsistencies among other cancer types. Additionally, it may support the development of new blood tests for evaluating cancer risk, to be translated to clinical practice, helping physicians make decisions about strategies for surveillance and risk reduction interventions.

## References

1. Assumpção, P., Araújo, T., Khayat, A., Ishak, G., Santos, S., Barra, W., Acioli, J.F., Rossi, B., Assumpção, P., 2020. Hereditary gastric cancer: Three rules to reduce missed diagnoses. *World journal of gastroenterology* 26, 1382 – 1393.
2. Blair, V.R., McLeod, M., Carneiro, F., Coit, D.G., D'Addario, J.L., van Dieren, J.M., Harris, K.L., Hoogerbrugge, N., Oliveira, C., van der Post, R.S., Arnold, J., Benusiglio, P.R., Bisseling, T.M., Boussioutas, A., Cats, A., Charlton, A., Schreiber, K.E.C., Davis, J.L., di Pietro, M., Fitzgerald, R.C., Ford, J.M., Gamet, K., Gullo, I., Hardwick, R.H., Huntsman, D.G., Kaurah, P., Kupfer, S.S., Latchford, A., Mansfield, P.F., Nakajima, T., Parry, S., Rossaak, J., Sugimura, H., Svrcek, M., Tischkowitz, M., Ushijima, T., Yamada, H., Yang, H., Claydon, A., Figueiredo, J., Paringatai, K., Seruca, R., Bougen-Zhukov, N., Brew, T., Busija, S., Carneiro, P., DeGregorio, L., Fisher, H., Gardner, E., Godwin, T.D., Holm, K.N., Humar, B., Lintott, C.J., Monroe, E.C., Muller, M.D., Norero, E., Nouri, Y., Paredes, J., Sanches, J.M., Schulpen, E., Ribeiro, A.S., Sporle, A., Whitworth, J., Zhang, L., Reeve, A.E., Guilford, P., 2020. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical practice guidelines. *The Lancet. Oncology* 21, e386 – e397.
3. Chen, H., Wang, J., Zhuang, Y., Wu, H., 2018. Identification of the potential molecular mechanism and driving mutations in the pathogenesis of familial intestinal gastric cancer by whole exome sequencing. *Oncology reports* 40, 2316 – 2324.
4. Cheng, L., Chen, S., Wu, W., Kuo, Z.C., Wei, Z., Meng, S., Chen, C., Zhang, C., He, Y., 2020. Gastric cancer in young patients: a separate entity with aggressive features and poor prognosis. *Journal of cancer research and clinical oncology* 146, 2937 – 2947.
5. Chernoff, J., 2021. The two-hit theory hits 50. *Molecular biology of the cell* 32, rt1 –.
6. Cingolani, P., Platts, A., Wang, L.L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Land, S.J., Lu, X., Ruden, D.M., 2012. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly* 6, 80 – 92.
7. Clark, D.F., Michalski, S.T., Tondon, R., Nehoray, B., Ebrahimzadeh, J., Hughes, S.K., Soper, E.R., Domchek, S.M., Rustgi, A.K., Pineda-Alvarez, D., Anderson, M.J., Katona, B.W., 2020. Loss-of-function variants in CTNNA1 detected on multigene panel testing in individuals with gastric or breast cancer. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 22, 840 – 846.
8. Cosma, L., Schlosser, S., Tews, H.C., Müller, M., Kandulski, A., 2022. Hereditary Diffuse Gastric Cancer: Molecular Genetics, Biological Mechanisms and Current Therapeutic Approaches. *International journal of molecular sciences* 23.

9. Cui, H., Srinivasan, S., Korkin, D., 2019. Enriching Human Interactome with Functional Mutations to Detect High-Impact Network Modules Underlying Complex Diseases. *Genes* 10.
10. Donner, I., Kiviluoto, T., Ristimäki, A., Aaltonen, L.A., Vahteristo, P., 2015. Exome sequencing reveals three novel candidate predisposition genes for diffuse gastric cancer. *Familial cancer* 14, 241 – 6.
11. Gall, T.M.H., Frampton, A.E., 2013. Gene of the month: E-cadherin (CDH1). *Journal of clinical pathology* 66, 928 – 32.
12. Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646 – 74.
13. Hansford, S., Kaurah, P., Li-Chang, H., Woo, M., Senz, J., Pinheiro, H., Schrader, K.A., Schaeffer, D.F., Shumansky, K., Zogopoulos, G., Santos, T.A., Claro, I., Carvalho, J., Nielsen, C., Padilla, S., Lum, A., Talhouk, A., Baker-Lange, K., Richardson, S., Lewis, I., Lindor, N.M., Pennell, E., MacMillan, A., Bridget Fernandez, Keller, G., Lynch, H., Shah, S.P., Guilford, P., Gallinger, S., Corso, G., Roviello, F., Caldas, C., Oliveira, C., Pharoah, P.D.P., Huntsman, D.G., 2015. Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. *JAMA oncology* 1, 23 – 32.
14. Herrera-Pariente, C., Capó-García, R., Díaz-Gay, M., Carballal, S., Muñoz, J., Llach, J., Ariadna Sánchez, Bonjoch, L., Arnau-Collell, C., de Lima, Y.S., Golubicki, M., Jung, G., Lozano, J.J., Castells, A., Balaguer, F., Bujanda, L., Castellví-Bel, S., Moreira, L., 2021. Identification of New Genes Involved in Germline Predisposition to Early-Onset Gastric Cancer. *International journal of molecular sciences* 22.
15. Kanehisa, M., Goto, S., 1999. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* 28, 27 – 30.
16. Kentsis, A., 2020. Why do young people get cancer? *Pediatric blood & cancer* 67, e28335 –.
17. Knudson, A.G., 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68, 820 – 3.
18. Kraft, I.L., Godley, L.A., 2020. Identifying potential germline variants from sequencing hematopoietic malignancies. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2020, 219 – 227.
19. Kumar, P., Henikoff, S., Ng, P.C., 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature protocols* 4, 1073 – 81.
20. Kumar, S., Long, J.M., Ginsberg, G.G., Katona, B.W., 2019. The role of endoscopy in the management of hereditary diffuse gastric cancer syndrome. *World journal of gastroenterology* 25, 2878 – 2886.
21. Landrum, M.J., Lee, J.M., Benson, M., Brown, G., Chao, C., Chitipiralla, S., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Hoover, J., Jang, W., Katz, K., Ovetsky, M., Riley, G., Sethi, A., Tully, R., Villamarin-Salomon, R., Rubinstein, W., Maglott, D.R., 2015. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic acids research* 44, D862 – 8.
22. Li, J., 2020. Gastric Cancer in Young Adults: A Different Clinical Entity from Carcinogenesis to Prognosis. *Gastroenterology research and practice* 2020, 9512707 –.
23. M.R., G., J., S., 2012. *Molecular Cloning*. 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

24. Oak, N., Cherniack, A.D., Mashl, R.J., Network, T.A., Hirsch, F.R., Ding, L., Beroukhi, R., Gümüő, Z.H., Plon, S.E., Huang, K., 2020. Ancestry-specific predisposing germline variants in cancer. *Genome medicine* 12, 51 –.
25. Oliveira, C., Pinheiro, H., Figueiredo, J., Seruca, R., Carneiro, F., 2015. Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *The Lancet. Oncology* 16, e60 – 70.
26. Pantelis, D., Hüneburg, R., Adam, R., Holzapfel, S., Gevensleben, H., Nattermann, J., Strassburg, C.P., Aretz, S., Kalff, J.C., 2016. Prophylactic total gastrectomy in the management of hereditary tumor syndromes. *International journal of colorectal disease* 31, 1825 – 1833.
27. Park, B., Yang, S., Lee, J., Woo, H.D., Choi, I.J., Kim, Y.W., Ryu, K.W., Kim, Y., Kim, J., 2018. Genome-Wide Association of Genetic Variation in the PSCA Gene with Gastric Cancer Susceptibility in a Korean Population. *Cancer research and treatment* 51, 748 – 757.
28. Pocurull, A., Herrera-Pariente, C., Carballal, S., Llach, J., Ariadna Sánchez, Carot, L., Botargues, J.M., Cuatrecasas, M., Ocaña, T., Balaguer, F., Bujanda, L., Moreira, L., 2021. Clinical, Molecular and Genetic Characteristics of Early Onset Gastric Cancer: Analysis of a Large Multicenter Study. *Cancers* 13.
29. Polom, K., Marrelli, D., D'Ignazio, A., Roviello, F., 2018. Hereditary diffuse gastric cancer: how to look for and how to manage it. *Updates in surgery* 70, 161 – 166.
30. Porta-Pardo, E., Valencia, A., Godzik, A., 2020. Understanding oncogenicity of cancer driver genes and mutations in the cancer genomics era. *FEBS letters* 594, 4233 – 4246.
31. van der Post, R.S., Oliveira, C., Guilford, P., Carneiro, F., 2019. Hereditary gastric cancer: what's new? Update 2013-2018. *Familial cancer* 18, 363 – 367.
32. Qing, T., Mohsen, H., Cannataro, V.L., Marczyk, M., Rozenblit, M., Foldi, J., Murray, M., Townsend, J.P., Kluger, Y., Gerstein, M., Pusztai, L., 2022. Cancer Relevance of Human Genes. *Journal of the National Cancer Institute* 114, 988 – 995.
33. Qing, T., Mohsen, H., Marczyk, M., Ye, Y., O'Meara, T., Zhao, H., Townsend, J.P., Gerstein, M., Hatzis, C., Kluger, Y., Pusztai, L., 2020a. Germline variant burden in cancer genes correlates with age at diagnosis and somatic mutation burden. *Nature communications* 11, 2438 –.
34. Qing, T., Mohsen, H., Marczyk, M., Ye, Y., O'Meara, T., Zhao, H., Townsend, J.P., Gerstein, M., Hatzis, C., Kluger, Y., Pusztai, L., 2020b. Germline variant burden in cancer genes correlates with age at diagnosis and somatic mutation burden. *Nature communications* 11, 2438 –.
35. Ribeiro-Dos-Santos, A.M., Vidal, A.F., Vinasco-Sandoval, T., Guerreiro, J., Santos, S., Ribeiro-Dos-Santos, A., de Souza, S.J., 2020. Exome Sequencing of Native Populations From the Amazon Reveals Patterns on the Peopling of South America. *Frontiers in genetics* 11, 548507 –.
36. Saeki, N., Ono, H., Sakamoto, H., Yoshida, T., 2012. Genetic factors related to gastric cancer susceptibility identified using a genome-wide association study. *Cancer science* 104, 1 – 8.
37. Scherer, A., Christensen, G.B., 2016. Concepts and relevance of genome-wide association studies. *Science progress* 99, 59 – 67.
38. Shenoy, S., 2019. CDH1 (E-Cadherin) Mutation and Gastric Cancer: Genetics, Molecular Mechanisms and Guidelines for Management. *Cancer management and research* 11, 10477 – 10486.
39. Shlien, A., Campbell, B.B., de Borja, R., Alexandrov, L.B., Merico, D., Wedge, D., Loo, P.V., Tarpey, P.S., Coupland, P., Behjati, S., Pollett, A., Lipman, T., Heidari, A.,

- Deshmukh, S., Avitzur, N., Meier, B., Gerstung, M., Hong, Y., Merino, D.M., Ramakrishna, M., Remke, M., Arnold, R., Panigrahi, G.B., Thakkar, N.P., Hodel, K.P., Henninger, E.E., Göksenin, A.Y., Bakry, D., Charames, G.S., Druker, H., Lerner-Ellis, J., Mistry, M., Dvir, R., Grant, R., Elhasid, R., Farah, R., Taylor, G.P., Nathan, P.C., Alexander, S., Ben-Shachar, S., Ling, S.C., Gallinger, S., Constantini, S., Dirks, P., Huang, A., Scherer, S.W., Grundy, R.G., Durno, C., Aronson, M., Gartner, A., Meyn, M.S., Taylor, M.D., Pursell, Z.F., Pearson, C.E., Malkin, D., Futreal, P.A., Stratton, M.R., Bouffet, E., Hawkins, C., Campbell, P.J., Tabori, U., Consortium, B.M.R.D., 2015. Combined hereditary and somatic mutations of replication error repair genes result in rapid onset of ultra-hypermuted cancers. *Nature genetics* 47, 257 – 62.
40. Tam, V., Patel, N., Turcotte, M., Bossé, Y., Paré, G., Meyre, D., 2019. Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nature reviews. Genetics* 20, 467 – 484.
41. Tomasetti, C., Li, L., Vogelstein, B., 2017. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science (New York, N.Y.)* 355, 1330 – 1334.
42. Ugai, T., Sasamoto, N., Lee, H., Ando, M., Song, M., Tamimi, R.M., Kawachi, I., Campbell, P.T., Giovannucci, E.L., Weiderpass, E., Rebbeck, T.R., Ogino, S., 2022. Is early-onset cancer an emerging global epidemic? Current evidence and future implications. *Nature reviews. Clinical oncology* 19, 656 – 673.
43. Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 2015. The Path to Cancer –Three Strikes and You're Out. *The New England journal of medicine* 373, 1895 – 8.
44. Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., Kinzler, K.W., 2013. Cancer genome landscapes. *Science (New York, N.Y.)* 339, 1546 – 58.
45. Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X., Zhou, B.P., 2013. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Current cancer drug targets* 13, 963 – 972.
46. Yan, C., Zhu, M., Ding, Y., Yang, M., Wang, M., Li, G., Ren, C., Huang, T., Yang, W., He, B., Wang, M., Yu, F., Wang, J., Zhang, R., Wang, T., Ni, J., Chen, J., Jiang, Y., Dai, J., Zhang, E., Ma, H., Wang, Y., Xu, D., Wang, S., Chen, Y., Xu, Z., Zhou, J., Ji, G., Wang, Z., Zhang, Z., Hu, Z., Wei, Q., Shen, H., Jin, G., 2019. Meta-analysis of genome-wide association studies and functional assays decipher susceptibility genes for gastric cancer in Chinese populations. *Gut* 69, 641 – 651.
47. Yeoh, K.G., Tan, P., 2021. Mapping the genomic diaspora of gastric cancer. *Nature reviews. Cancer* 22, 71 – 84.
48. Zhang, H., Feng, M., Feng, Y., Bu, Z., Li, Z., Jia, S., Ji, J., 2018. Germline mutations in hereditary diffuse gastric cancer. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu* 30, 122 – 130.
49. Zhang, L., Hu, D., Huangfu, S., Zhou, J., Wang, W., Liu, S., Tang, H., Pan, J., Pan, Y., 2022. DNA Repair and Replication-Related Gene Signature Based on Tumor Mutation Burden Reveals Prognostic and Immunotherapy Response in Gastric Cancer. *Journal of oncology* 2022, 6469523 –.

## 7 DISCUSSÃO

O adenocarcinoma gástrico apresenta incidência e mortalidade muito elevadas, especialmente no Estado do Pará (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2022). A letalidade destes tumores é alta, principalmente nos países em desenvolvimento, decorrente de diagnósticos tardios, situações nas quais as alternativas terapêuticas são, ainda, pouco eficazes (SUNG *et al.*, 2021).

Trata-se de doença silenciosa, nas fases iniciais, e requer procedimentos endoscópicos invasivos para seu diagnóstico, cuja disponibilidade é, ainda, limitada, especialmente nas regiões de menor desenvolvimento (ILIC; ILIC, 2022; EUSEBI *et al.*, 2020)

As investigações diagnósticas são, usualmente, motivadas por sintomas ou sinais, que quando presentes, na maioria dos casos, refletem doença avançada resultando em morbidade e letalidade elevadas (MAZIDIMORADI *et al.*, 2021).

A maioria dos casos ocorre a partir da sexta década de vida e é considerada esporádicos, sem componente hereditário. Há, entretanto, número crescente de diagnósticos dentre indivíduos jovens, situação na qual a contribuição de componentes genéticos herdáveis torna-se, supostamente mais relevante (POCURULL *et al.*, 2021).

O diagnóstico de cânceres com componente hereditário alberga importantes repercussões. Ademais do paciente acometido cujo diagnóstico já está estabelecido, assim como os demais procedimentos de estadiamento e terapêuticos, conforme definidos em protocolos médicos, seus familiares podem ter riscos aumentados para a doença (OLIVEIRA *et al.*, 2015; BLAIR *et al.*, 2020).

A identificação de grupos de risco, especialmente em casos de doença neoplásica de difícil diagnóstico quando nas fases iniciais, pode representar oportunidade de intervenção e modificação de desfechos de forma exuberante e não deve ser desprezada (LUU *et al.*, 2021; MARCOS-PINTO *et al.*, 2013).

Dentre os cânceres gástricos hereditários, os mais frequentes são os difusos, decorrentes, classicamente, de mutações germinativas patogênicas em CDH1. Nesta

situação há recomendações formais para intervenções diagnósticas e terapêuticas dirigidas aos familiares, objetivando redução ou eliminação do risco deste tipo de câncer para aqueles portadores da variante patogênica (LUO *et al.*, 2018; SHENOY, 2019).

Não obstante existirem muitos casos de pacientes jovens diagnosticados com adenocarcinoma gástrico, o número de confirmações moleculares das mutações reconhecidas como causais para o CG hereditário, no Brasil, é extremamente baixo, mesmo nos centros com recursos tecnológicos para realizar estas investigações moleculares (VIDAL *et al.*, 2021).

No Brasil, e especialmente no Estado do Pará, há uma discrepância entre o número de casos clinicamente suspeitos de CG hereditário e os efetivos diagnósticos moleculares desta doença, diferindo do que é descrito para outras populações (CURADO *et al.*, 2019).

Considera-se, portanto, que peculiaridades inerentes à população brasileira poderiam contribuir para esta disparidade. Acrescenta-se o escasso conhecimento sobre características moleculares do CG, no Brasil, como fator adicional a ser desbravado para reduzir as citadas inconsistências (LEITE *et al.*, 2022).

A população brasileira tem como característica a intensa miscigenação devido à mistura étnica de indivíduos provenientes de três continentes: os colonizadores europeus, os escravos africanos e nativos americanos (SANTOS *et al.*, 2009).

O conhecimento existente a respeito das características moleculares do câncer gástrico, e especialmente sobre o câncer gástrico hereditário, foi gerado em outras populações, principalmente europeias, e podem não ser adequadamente reprodutíveis na população brasileira, considerando-se que as frequências alélicas de um determinado marcador variam entre as diferentes subpopulações ancestrais (TEE *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2020).

No Estado do Pará, a contribuição ancestral Ameríndia é especialmente elevada. Neste grupo, o conhecimento sobre características genéticas com eventual contribuição para riscos de doenças, em especial aos cânceres e ao CG, objeto deste estudo, é, ainda, muito restrito (SILVA *et al.*, 2017).

Igualmente, o acesso ao diagnóstico do CG, dentre os Ameríndios, é muito limitado e, em consequência, a epidemiologia sobre a doença nesta população, é desconhecida.

No Brasil, e de forma mais marcante no Estado do Pará, o GC que acomete indivíduos jovens, não encontra, com frequência, justificativa genética referendada por diagnóstico molecular de mutação patogênica internacionalmente reconhecida no espectro dos cânceres gástricos hereditários (MOREIRA-NUNES *et al.*, 2014).

Comungam para esta constatação diversos fatores, conforme abordados nas publicações integrantes desta tese, além de outros ainda a serem investigados.

O baixo índice de suspeição clínica para o diagnóstico de CG hereditário constitui fator primordial, pois não havendo suspeita, não se produzem diagnósticos.

Conforme debatido em “Hereditary gastric cancer: Three rules to reduce missed diagnoses”, as recomendações científicas para o estabelecimento de diagnósticos de CG hereditários, à época vigentes, eram complexas e em grande número, difíceis de serem fixadas, mesmo para especialistas dedicados ao tema (ASSUMPCÃO *et al.*, 2020a).

Desde aquela publicação, ocorreram atualizações no Consenso *International Gastric Cancer Linkage Consortium*, entretanto ainda persistem as limitações para sua ampla aplicação, especialmente para generalistas, ou mesmo especialistas, sem larga e constante vivência no tema específico (BLAIR *et al.*, 2020).

Não se nega aqui a importância do Consenso e das regras balizadoras nele propagadas, nem se pretende infringi-las. Debateremos sim o alcance clínico destas orientações pela complexidade que envolvem. Desta forma o artigo produzido neste doutorado vislumbra contemplar aqueles que, na maioria das vezes tem o contato inicial com pacientes candidatos a portadores de CG hereditários, sejam médicos generalistas, especialistas, ou ainda outros profissionais de saúde não médicos (ASSUMPCÃO *et al.*, 2020a).

Diante da gravidade e agressividade da doença, a repercussão do tempo para o diagnóstico impacta no desfecho para o paciente acometido, e eventualmente, reduz as

chances de familiares se beneficiarem de medidas de prevenção e até de cirurgias redutoras de risco (COSMA *et al.*, 2022).

As “três regras”, são acessíveis a todos, independentemente do grau de especialização ou experiência no tema, e podem sinalizar a pertinência de referenciamento para centros dedicados ao manuseio do GC hereditário, capazes de conduzir adequadamente cada situação clínica. Ampliam-se, assim as oportunidades de diagnóstico clínico e molecular, e em consequência, melhoram-se os desfechos clínicos.

A publicação deste artigo em revista de impacto científico relevante e grande penetração no meio acadêmico, pode contribuir para o atingimento de seu objetivo educativo, disseminando a informação e, possivelmente trazendo benefícios aos indivíduos, o que traduz a finalidade das investigações científicas na área da saúde.

Outro aspecto relevante, possivelmente contribuidor para o baixo número de diagnósticos de CG hereditário, consiste na hipotética inadequação dos alvos moleculares internacionalmente referendados, quando investigados na população brasileira (ANDRADE *et al.*, 2022).

Aqui também não se pratica negação aos alvos cientificamente descritos e comprovados. Argumenta-se, entretanto não serem suficientes para contemplar o grande número de casos de CG em pacientes jovens, cuja origem populacional difere daquelas nas quais as mutações foram descobertas.

Defende-se a descoberta e incorporação de novas variantes moleculares adicionais às já estabelecidas em estudos científicos validados, desenvolvidos em outras populações, dentre as potencialmente implicadas no risco aumentado de CG.

O estudo apresentado e submetido à publicação em revista científica especializada e de elevado fator de impacto, consiste em robusta investigação molecular, por meio de sequenciamento completo de exoma de 95 pacientes portadores de adenocarcinomas gástricos, diagnosticados antes dos 50 anos de idade.

Trata-se de grupo peculiar pois, conforme reconhecido, os CG esporádicos são usualmente diagnosticados em indivíduos de idades mais avançadas. Tratar-se-iam,

portanto de pacientes “capturáveis” para investigação adicional pela proposta das “três regras”, descrita nesta tese.

Neste grupo foram investigados dois diferentes aspectos: um quantitativo, analisando números de mutações; outro qualitativo, descrevendo mutações de impacto funcional a serem complementarmente estudadas e validas a fim de, caso tenham sem papel no aumento do risco do CG confirmadas, serem testadas em estudos clínicos e, eventualmente passem a integrar estratégias oficiais de rastreamento no CG.

Ressalta-se novamente a importância da característica populacional dos casos e do grupo controle, composto por Ameríndios da Amazônia, população da qual, hipoteticamente, os casos teriam herdado variantes de risco para o CG.

Os resultados deste estudo preliminar foram promissores. O número de variantes germinativas potencialmente relacionadas ao risco de CG foi maior nos casos do que nos controles, fortalecendo a hipótese de que mutações germinativas em elevado número favorecem a ocorrência de CG, considerando-se a presença de maior número de alvos para o “*second hit*” somático, complementando a sequência de eventos da carcinogênese reconhecida no câncer hereditário (KNUDSON, 1971).

Adicionalmente, na análise de *subsets* de genes de elevados impactos funcionais, relevantes para doenças médicas e dentre *hallmarks* de câncer, o número de mutações em casos superou o dos controles.

A hipótese de que mutações em genes de replicação e reparo do DNA aumentariam o risco de mutações adicionais e de CG não foi estatisticamente comprovada, visto que o número de mutações nestes genes, não obstante ter sido maior no grupo CG, foi muito baixo, e diante do pequeno número de casos sequenciados em ambos os grupos, não obteve força estatística para demonstrar esta diferença.

O aumento do número de mutações neste *subset* de genes, tanto nos casos quanto nos controles é acompanhado de aumento global de mutações. Entretanto, não é possível atribuir a eles um vínculo causal, pois poderiam ser, inversamente, consequência do aumento global de mutações.

Merece destaque, por reforçar a hipótese da participação de outras variantes diferentes daquelas oficialmente reconhecidas como de risco para CG hereditário, o baixíssimo número de mutações em CDH1.

Mesmo em outros genes que poderiam influenciar a atividade funcional relacionada ao CDH1, integrantes de sua via, o número de mutações foi muito baixo, novamente sustentando o argumento em favor da busca de outras alterações genéticas que pudessem contribuir para a ocorrência de CG em pacientes jovens nos quais as mutações internacionalmente consagradas não estão presentes.

Em relação às análises qualitativas, inúmeras variantes com alto impacto funcional foram identificadas e requerem validações para caso confirmadas, serem testadas e eventualmente consolidadas com marcadores de risco passíveis de uso clínico no CG.

No espectro das variantes descritas, algumas encontradas no grupo CG estão também presentes nos Ameríndios e sem qualquer citação prévia nos diversos bancos de dados internacionais. Esta constatação poderia representar uma via de carcinogênese peculiar a esta população, na qual a mutação germinativa exclusiva da ancestralidade Ameríndia contribuiria para o risco de CG, favorecendo o entendimento de mecanismos adicionais implicados no risco de CG em pacientes que não apresentam as variantes atualmente reconhecidas como causais.

Dentre as mais frequentes, neste contexto, citam-se as do gene LILRB1 membro da família do receptor semelhante à imunoglobulina de leucócitos (LIR), localizado na região cromossômica 19q13.4, neste estudo presentes em 31 indivíduos com CG e em 13 Ameríndios, e jamais descrita previamente em bancos de mutações (BROWN *et al.*, 2004).

O gene LILRB1 codifica uma molécula imunossupressora pertencente à família de receptores LIR. O receptor é expresso em células imunes onde se liga a moléculas MHC de classe I em células apresentadoras de antígenos e inibe a estimulação de resposta imune (OLIVEIRA *et al.*, 2022). Atua no controle de resposta inflamatória e citotoxicidade, contribuindo para regular a resposta imune e limitar a autorreatividade. Sua disfunção já foi associada a situações clínicas como malária e infecção por citomegalovírus (MICHELO *et al.*, 2018; BARKAL *et al.*, 2017), além de representar um potencial alvo para imunoterapia no câncer (BARKAL *et al.*, 2017). (ZHANG *et al.*, 2021) o descrevem como um marcador de mau prognóstico no câncer gástrico.

O estudo confirmatório destas variantes, e de suas repercussões funcionais, assim como de outras variantes descobertas deste experimento, serão objetos de investigações dirigidas complementares, a serem desenvolvidas pelo mesmo grupo de pesquisas idealizador do projeto.

Ainda dentre as descobertas, há variantes exclusivas do grupo CG e igualmente sem descrição nos bancos de mutações internacionais. Mesmo não estando presentes do grupo controle Ameríndio, caso validadas, poderão ser também incluídas como variantes de risco, de interesse clínico. Serão, adicionalmente, contempladas por estudos complementares em desenvolvimento neste Núcleo de Pesquisas em Oncologia.

A descrição das inúmeras variantes encontradas, muitas das quais inéditas na literatura, abre horizontes para investigações complementares e perspectivas de inovações diagnósticas relevantes. Cumpre-se, também aqui, outra importante finalidade da pesquisa.

Cabe, ainda, breve comentário sobre o capítulo I, relativo à publicação "Lymph nodes may be a source for immunotherapy in gastric cancer", também no tema CG, mas com outro enfoque, não restrito ao câncer hereditário (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2020b).

Dentre os avanços recentes mais significativos na área de oncologia o emprego da imunoterapia destacou-se pelo impacto causado em desfechos clínicos de alguns tipos de adenocarcinoma gástrico (COUTZAC *et al.*, 2019; LORDICK *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2022).

A inibição da via de PD-1 por meio de anticorpos provocou verdadeira revolução na prática médica. Entretanto, muitas incertezas persistem e requerem investigações científicas adicionais (TAKEI *et al.*, 2022; HÖGNER; MOEHLER, 2022).

O estudo apresentado e publicado demonstrou que linfonodos na via de drenagem do estômago podem ser importantes players na interação câncer/resposta imune.

Estes linfonodos poderiam ser considerados como fontes alternativas de células imunes para ensaios de imunoterapia adotiva, tendo como vantagem potencial,

concentrarem grande número de linfócitos já expostos aos imunógenos tumorais (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2020b).

Não obstante tratar-se de investigação modesta, o estudo pretendeu oferecer contribuição científica adicional em área de conhecimento emergente na oncologia e cuja translação à prática clínica vem ocorrendo expressivamente.

Dentre os diversos ensinamentos adquiridos na trajetória do curso a importância das iniciativas científicas locais dedicadas a doenças de importância regional e com peculiaridades próprias da população foi marcante.

Neste contexto, a investigação de possíveis variantes, peculiares à população brasileira, capazes de preencher parte da lacuna de conhecimento sobre fatores genéticos de risco para o CG nesta população, atendeu a esta necessidade, abrindo horizontes para futuras investigações adicionais com vistas a beneficiar a população acometida e sob risco de CG.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1000GENOMES. Disponível em: <[www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org)>.

ADZHUBEI, I. A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*, v. 7, p. 248 – 9, 4 2010.

ANDRADE, R. B. *et al.* The Search for Cancer Biomarkers: Assessing the Distribution of INDEL Markers in Different Genetic Ancestries. *Current issues in molecular biology*, v. 44, p. 2275 – 2286, 6 2022.

ASSOCIATION, J. G. C. Japanese Gastric Cancer Treatment Guidelines 2021 (6th edition). Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association, 11 2022.

ASSUMPCÃO, P. *et al.* Hereditary gastric cancer: Three rules to reduce missed diagnoses. *World journal of gastroenterology*, v. 26, p. 1382 – 1393, 4 2020a.

ASSUMPCÃO, P. B. *et al.* Lymph nodes may be a source for immunotherapy in gastric cancer. *Oncotarget*, v. 11, p. 1729 – 1736, 6 2020b.

BARCHI, L. C. *et al.* BRAZILIAN GASTRIC CANCER ASSOCIATION GUIDELINES (PART 1): AN UPDATE ON DIAGNOSIS, STAGING, ENDOSCOPIC TREATMENT AND

BARKAL, A. A. *et al.* Engagement of MHC class I by the inhibitory receptor LILRB1 suppresses macrophages and is a target of cancer immunotherapy. *Nature immunology*, v. 19, p. 76 – 84, 11 2017.

BECKER, K. F. *et al.* E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer research*, v. 54, p. 3845 – 52, 7 1994.

BEER, A. *et al.* Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS) a rare recently described gastric polyposis syndrome - report of a case. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*, v. 55, p. 1131 – 1134, 11 2017.

BERGER, M. F.; MARDIS, E. R. The emerging clinical relevance of genomics in cancer medicine. *Nature reviews. Clinical oncology*, v. 15, p. 353 – 365, 3 2018.

- BERX, G. *et al.* Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics*, v. 26, p. 281 – 9, 3 1995.
- BLAIR, V. R. *et al.* Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical practice guidelines. *The Lancet. Oncology*, v. 21, p. e386 – e397, 8 2020.
- BROWN, D. *et al.* The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue antigens*, v. 64, p. 215 – 25, 8 2004.
- CALDAS, C. *et al.* Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *Journal of medical genetics*, v. 36, p. 873 – 80, 12 1999.
- CALIFORNIA. Illumina Systems. Disponível em: [http://www.illumina.com/systems/hiseq\\_2000\\_1000.ilmn](http://www.illumina.com/systems/hiseq_2000_1000.ilmn).
- CANO, A. *et al.* The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature cell biology*, v. 2, p. 76 – 83, 2 2000.
- CARVALHO, J. *et al.* Redefinition of familial intestinal gastric cancer: clinical and genetic perspectives. *Journal of medical genetics*, v. 58, p. 1 – 11, 2 2020.
- CHEN, H. *et al.* Identification of the potential molecular mechanism and driving mutations in the pathogenesis of familial intestinal gastric cancer by whole exome sequencing. *Oncology reports*, v. 40, p. 2316 – 2324, 8 2018.
- COLVIN, H. *et al.* Hereditary Gastric Cancer Syndromes. *Surgical oncology clinics of North America*, v. 24, p. 765 – 77, 9 2015.
- CORREA, P. Gastric cancer: overview. *Gastroenterology clinics of North America*, v. 42, p. 211 – 7, 5 2013.
- CORREA, P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *The American journal of surgical pathology*, v. 19 Suppl 1, p. S37 – 43, 1 1995.
- CORSO, G. *et al.* CDH1 germline mutations and hereditary lobular breast cancer. *Familial cancer*, v. 15, p. 215 – 9, 1 2016.
- COSMA, L. *et al.* Hereditary Diffuse Gastric Cancer: Molecular Genetics, Biological Mechanisms and Current Therapeutic Approaches. *International journal of molecular sciences*, v. 23, 7 2022.

- COUTZAC, C. *et al.* Immunotherapy in advanced gastric cancer, is it the future? Critical reviews in oncology/hematology, v. 133, p. 25 – 32, 1 2019.
- COWELL, C. F. *et al.* Loss of cell-cell contacts induces NF-kappaB via RhoA-mediated activation of protein kinase D1. Journal of cellular biochemistry, v. 106, p. 714 – 28, 1 2009.
- CURADO, M. P. *et al.* Disparities in Epidemiological Profile of Gastric Adenocarcinoma in Selected Cities of Brazil. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP, v. 20, p. 2253 – 2258, 8 2019.
- DEKKER, W.; ORTH, J. O. O. D. Early gastric cancer. Radiologia clinica, v. 46, p. 115 – 29, 1 1977.
- EUSEBI, L. H. *et al.* Gastric cancer prevention strategies: A global perspective. Journal of gastroenterology and hepatology, v. 35, p. 1495 – 1502, 3 2020.
- FOLLOW-UP. Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva : ABCD = Brazilian archives of digestive surgery, v. 33, p. e1535 –, 12 2020.
- GALL, T. M. H.; FRAMPTON, A. E. Gene of the month: E-cadherin (CDH1). Journal of clinical pathology, v. 66, p. 928 – 32, 8 2013.
- GAYTHER, S. A. *et al.* Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. Cancer research, v. 58, p. 4086 – 9, 9 1998.
- GNOMAD. Disponível em: <https://gnomad.broadinstitute.org/>.
- GOTTARDI, C. J. *et al.* E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. The Journal of cell biology, v. 153, p. 1049 – 60, 5 2001.
- GUILFORD, P. *et al.* E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. Nature, v. 392, p. 402 – 5, 4 1998.
- GUIMARÃES, R. M.; MUZI, C. D. Trend of mortality rates for gastric cancer in Brazil and regions in the period of 30 years (1980-2009). Arquivos de gastroenterologia, v. 49, p. 184 – 8, 9 2012.

HAMANISHI, J. *et al.* PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. *International journal of clinical oncology*, v. 21, p. 462 – 73, 2 2016.

HANSFORD, S. *et al.* Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. *JAMA oncology*, v. 1, p. 23 – 32, 7 2015.

HÖGNER, A.; MOEHLER, M. Immunotherapy in Gastric Cancer. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, v. 29, p. 1559 – 1574, 3 2022.

HUANG, R. J. *et al.* One Size Does Not Fit All: Marked Heterogeneity in Incidence of and Survival from Gastric Cancer among Asian American Subgroups. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, v. 29, p. 903 – 909, 3 2020.

HUNTSMAN, D. G. *et al.* Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germline E-cadherin mutations. *The New England journal of medicine*, v. 344, p. 1904 – 9, 6 2001.

ILIC, M.; ILIC, I. Epidemiology of stomach cancer. *World journal of gastroenterology*, v. 28, p. 1187 – 1203, 4 2022.

ILLUMINA Sequencing Software. Disponível em: [https://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_software/sequencing\\_analysis\\_viewer\\_sav.html](https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/sequencing_analysis_viewer_sav.html).

ILLUMINA Software Casava. Disponível em: [https://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_software/casava.htm](https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/casava.htm).

ILLUSTRATION, S. Art Station. 2016. Disponível em: [https://www.artstation.com/?sort\\_by=trending](https://www.artstation.com/?sort_by=trending). Acesso em: 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estatísticas do Câncer- INCA 2022. Estatísticas do Câncer, Rio de Janeiro, p. 1 – 10, 2022.

JEANES, A. *et al.* Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*, v. 27, p. 6920 – 9, 11 2008.

KAMPS, R. *et al.* Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *International journal of molecular sciences*, v. 18, 2 2017.

KIM, B. S. *et al.* Differences in prognostic factors between early and advanced gastric cancer. *Hepato-gastroenterology*, v. 58, p. 1032 – 40, 8 2011a.

KIM, B. S. *et al.* Differences in prognostic factors between early and advanced gastric cancer. *Hepato-gastroenterology*, v. 58, p. 1032 – 40, 8 2011b.

KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 68, p. 820 – 3, 4 1971.

KOURTIDIS, A. *et al.* p120 catenin: an essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression. *Progress in molecular biology and translational science*, v. 116, p. 409 – 32, 3 2013.

KOUWEN, M. C. A. van *et al.* [18F]Fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography detects gastric carcinoma in an early stage in an asymptomatic E-cadherin mutation carrier. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 10, p. 6456 – 9, 10 2004.

KUMAR, P. *et al.* Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature protocols*, v. 4, p. 1073 – 81, 6 2009.

KUMAR, S. *et al.* The role of endoscopy in the management of hereditary diffuse gastric cancer syndrome. *World journal of gastroenterology*, v. 25, p. 2878 – 2886, 6 2019.

LEITE, A. C. R. *et al.* What can we learn from more than 1,000 Brazilian patients at risk of hereditary cancer? *Frontiers in oncology*, v. 12, p. 963910 –, 9 2022.

LEWIS, F. R. *et al.* Prophylactic total gastrectomy for familial gastric cancer. *Surgery*, v. 130, p. 612–7; discussion 617–9 –, 10 2001.

LI, D. *et al.* Merging perspectives: genotype-directed molecular therapy for hereditary diffuse gastric cancer (HDGC) and E-cadherin-EGFR crosstalk. *Clinical and translational medicine*, v. 7, p. 7 –, 2 2018.

LIU, Y. *et al.* Novel insight into the role of immunotherapy in gastrointestinal cancer (Review). *Molecular and clinical oncology*, v. 17, p. 157 –, 11 2022.

LORDICK, F. *et al.* New agents on the horizon in gastric cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, v. 28, p. 1767 – 1775, 2 2017.

LUO, W. *et al.* CDH1 Gene and Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: Molecular and Histological Alterations and Implications for Diagnosis And Treatment. *Frontiers in pharmacology*, v. 9, p. 1421 –, 12 2018.

LUU, M. N. *et al.* Screening and surveillance for gastric cancer: Does family history play an important role in shaping our strategy? *Asia-Pacific journal of clinical oncology*, v. 18, p. 353 – 362, 11 2021.

MACDONALD, J. S. Gastric cancer: chemotherapy of advanced disease. *Hematological oncology*, v. 10, p. 37 – 42, 1 1992.

MACHLOWSKA, J. *et al.* Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies. *International journal of molecular sciences*, v. 21, 6 2020.

MAHON, S. M. Whole Exome Sequencing: The Next Phase of Genetics Care. *Oncology nursing forum*, v. 43, p. 249 – 52, 2 2016.

MARCOS-PINTO, R. *et al.* First-degree relatives of early-onset gastric cancer patients show a high risk for gastric cancer: phenotype and genotype profile. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, v. 463, p. 391 – 9, 7 2013.

MASTORAKI, A. *et al.* Prophylactic total gastrectomy for hereditary diffuse gastric cancer. Review of the literature. *Surgical oncology*, v. 20, p. e223 – 6, 8 2011.

MAZIDIMORADI, A. *et al.* Barriers and Facilitators Associated with Delays in the Diagnosis and Treatment of Gastric Cancer: a Systematic Review. *Journal of gastrointestinal cancer*, v. 53, p. 782 – 796, 9 2021.

MELO, S. *et al.* Predicting the Functional Impact of CDH1 Missense Mutations in Hereditary Diffuse Gastric Cancer. *International journal of molecular sciences*, v. 18, 12 2017.

MICHELO, C. M. *et al.* Human Cytomegalovirus Infection Increases Both Antibody- and Non-Antibody-Dependent Cellular Reactivity by Natural Killer Cells. *Transplantation direct*, v. 3, p. e335 –, 3 2018.

MINCIS, M. *Gastroenterologia e hepatologia: Diagnóstico e tratamento.* [S.l.]: Manole, 2013.

MITSUI, Y. *et al.* First report of an Asian family with gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS) revealed with the germline mutation of the APC exon 1B promoter region. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*, v. 21, p. 1058 – 1063, 7 2018.

MOREIRA-NUNES, C. A. *et al.* Genetic screening analysis of patients with hereditary diffuse gastric cancer from northern and northeastern Brazil. *Hereditary cancer in clinical practice*, v. 12, p. 18 –, 9 2014.

NAM, S. *et al.* RHOA in Gastric Cancer: Functional Roles and Therapeutic Potential. *Frontiers in genetics*, v. 10, p. 438 –, 6 2019.

NETWORK, C. G. A. R. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, v. 513, p. 202 – 9, 8 2014.

NIESSEN, C. M.; GOTTARDI, C. J. Molecular components of the adherens junction. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1778, p. 562 – 71, 1 2008.

NORTON, J. A. *et al.* CDH1 truncating mutations in the E-cadherin gene: an indication for total gastrectomy to treat hereditary diffuse gastric cancer. *Annals of surgery*, v. 245, p. 873 – 9, 5 2007.

OLIVEIRA, C. *et al.* Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *The Lancet. Oncology*, v. 16, p. e60 – 70, 2 2015.

OLIVEIRA, C. *et al.* Quantification of epigenetic and genetic 2nd hits in CDH1 during hereditary diffuse gastric cancer syndrome progression. *Gastroenterology*, v. 136, p. 2137 – 48, 3 2009.

OLIVEIRA, M. L. G. *et al.* Genetic diversity of the LILRB1 and LILRB2 coding regions in an admixed Brazilian population sample. *HLA*, v. 100, p. 325 – 348, 6 2022.

ONDER, T. T. *et al.* Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer research*, v. 68, p. 3645 – 54, 5 2008.

PANTELIS, D. *et al.* Prophylactic total gastrectomy in the management of hereditary tumor syndromes. *International journal of colorectal disease*, v. 31, p. 1825 – 1833, 9 2016.

PATEL, T. H.; CECCHINI, M. Targeted Therapies in Advanced Gastric Cancer. *Current treatment options in oncology*, v. 21, p. 70 –, 7 2020.

PEINADO, H. *et al.* Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *The International journal of developmental biology*, v. 48, p. 365 – 75, 9 2004.

PHAROAH, P. D. *et al.* Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology*, v. 121, p. 1348 – 53, 12 2001a.

PHAROAH, P. D. *et al.* Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology*, v. 121, p. 1348 – 53, 12 2001b.

POCURULL, A. *et al.* Clinical, Molecular and Genetic Characteristics of Early Onset Gastric Cancer: Analysis of a Large Multicenter Study. *Cancers*, v. 13, 7 2021.

POOROLAJAL, J. *et al.* Risk factors for stomach cancer: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiology and health*, v. 42, p. e2020004 –, 2 2020.

POST, R. S. van der *et al.* Hereditary gastric cancer: what's new? Update 2013-2018. *Familial cancer*, v. 18, p. 363 – 367, 4 2019.

POST, R. S. van der *et al.* Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. *Journal of medical genetics*, v. 52, p. 361 – 74, 5 2015.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. M. *et al.* Exome Sequencing of Native Populations From the Amazon Reveals Patterns on the Peopling of South America. *Frontiers in genetics*, v. 11, p. 548507 –, 11 2020.

RUDLOFF, U. Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach: diagnosis and clinical perspectives. *Clinical and experimental gastroenterology*, v. 11, p. 447 – 459, 12 2018.

SANTOS, N. P. C. *et al.* Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Human mutation*, v. 31, p. 184 – 90, 12 2009.

SCHMIDT, B.; YOON, S. S. D1 versus D2 lymphadenectomy for gastric cancer. *Journal of surgical oncology*, v. 107, p. 259 – 64, 4 2012.

SHENOY, S. CDH1 (E-Cadherin) Mutation and Gastric Cancer: Genetics, Molecular Mechanisms and Guidelines for Management. *Cancer management and research*, v. 11, p. 10477 – 10486, 12 2019.

SILVA, E. M. da *et al.* Effect of genetic ancestry to the risk of susceptibility to gastric cancer in a mixed population of the Brazilian Amazon. *BMC research notes*, v. 10, p. 646 –, 12 2017.

SMYTH, E. C. *et al.* Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, v. 27, p. v38 – v49, 9 2016.

STEMMLER, M. P. Cadherins in development and cancer. *Molecular bioSystems*, v. 4, p. 835 – 50, 7 2008.

SUN, G. *et al.* Caveolin-1, E-cadherin and  $\beta$ -catenin in Gastric Carcinoma, Precancerous Tissues and Chronic Non-atrophic Gastritis. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu*, v. 24, p. 23 – 8, 1 2013.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 71, p. 209 – 249, 2 2021.

TAKEI, S. *et al.* The New Era of Immunotherapy in Gastric Cancer. *Cancers*, v. 14, 2 2022.

TEE, M. C. *et al.* Oncologic and surgical outcomes for gastric cancer patients undergoing gastrectomy differ by race in the United States. *European journal of surgical oncology : the*

journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology, v. 46, p. 1941 – 1947, 5 2020.

TOMASETTI, C. *et al.* Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science (New York, N.Y.)*, v. 355, p. 1330 – 1334, 3 2017.

TOMASETTI, C.; VOGELSTEIN, B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science (New York, N.Y.)*, v. 347, p. 78 – 81, 1 2015.

TORRE, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 65, p. 87 – 108, 2 2015.

VERMA, R.; SHARMA, P. C. Next generation sequencing-based emerging trends in molecular biology of gastric cancer. *American journal of cancer research*, v. 8, p. 207 – 225, 3 2018.

VIDAL, A. F. *et al.* Comprehensive analysis of germline mutations in northern Brazil: a panel of 16 genes for hereditary cancer-predisposing syndrome investigation. *BMC cancer*, v. 21, p. 363 –, 4 2021.

WAGNER, A. D. *et al.* Chemotherapy for advanced gastric cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*, p. CD004064 –, 3 2010.

WARR, A. *et al.* Exome Sequencing: Current and Future Perspectives. *G3 (Bethesda, Md.)*, v. 5, p. 1543 – 50, 7 2015.

WASHINGTON, K. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Annals of surgical oncology*, v. 17, p. 3077 – 9, 10 2010.

WELCH, H. G. *et al.* Epidemiologic Signatures in Cancer. *The New England journal of medicine*, v. 381, p. 1378 – 1386, 10 2019.

WHEELOCK, M. J.; JOHNSON, K. R. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annual review of cell and developmental biology*, v. 19, p. 207 – 35, 10 2003.

WORSTER, E. *et al.* The impact of prophylactic total gastrectomy on health-related quality of life: a prospective cohort study. *Annals of surgery*, v. 260, p. 87 – 93, 1 2014a.

WORSTER, E. *et al.* The impact of prophylactic total gastrectomy on health-related quality of life: a prospective cohort study. *Annals of surgery*, v. 260, p. 87 – 93, 1 2014b.

WORTHLEY, D. L. *et al.* Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS): a new autosomal dominant syndrome. *Gut*, v. 61, p. 774 – 9, 8 2011.

YAKIREVICH, E.; RESNICK, M. B. Pathology of gastric cancer and its precursor lesions. *Gastroenterology clinics of North America*, v. 42, p. 261 – 84, 5 2013.

YAMAMOTO, H. *et al.* An updated review of gastric cancer in the next-generation sequencing era: insights from bench to bedside and vice versa. *World journal of gastroenterology*, v. 20, p. 3927 – 37, 4 2014.

ZHANG, Y. *et al.* Poor Prognosis and Therapeutic Responses in LILRB1-Expressing M2 Macrophages-Enriched Gastric Cancer Patients. *Frontiers in oncology*, v. 11, p. 668707 – , 9 2021.