

**AVALIAÇÃO DO PERFIL MUTACIONAL, EXPRESSÃO
PROTÉICA, REGRESSÃO TUMORAL E DAS
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES COM
CÂNCERES GÁSTRICOS LOCALMENTE AVANÇADOS
SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA PERIOPERATÓRIA**

ADRIANA PINHEIRO BEZERRA PIRES

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interinstitucional (DINTER) em
Oncologia da Fundação Antônio Prudente em
Parceria com Escola Cearense de Oncologia,
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de concentração: Oncologia**

Orientadora: Dra Dirce Maria Carraro

**Co-Orientadora: Dra Rosane Oliveira de
Sant'Ana**

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Pires, Adriana Pinheiro Bezerra

Avaliação do perfil mutacional, expressão protéica e regressão tumoral em pacientes com cânceres gástricos localmente avançados submetidos à quimioterapia perioperatória / Adriana Pinheiro Bezerra
Pires – São Paulo, 2017.

159p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente e Escola Cearense de Oncologia-ECO. Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER)
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:Oncologia.

Orientadora: Dirce Maria carraro

Descritores: 1. Neoplasias gástricas/Stomach Neoplasms. 2. Imuno-Histoquímica/ Immunohistochemistry. 3. Quimioterapia/Drug Therapy. 4. Indução de Remissão/Remission Induction

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Ralph, minhas filhas Júlia e Isadora, minha irmã Beatriz e minha querida Irismar, obrigada pelo apoio e carinho que sempre me motivaram a nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao programa de Pós-Graduação DINTER e as Instituições A.C.Camargo Cancer Center e Hospital Haroldo Juaçaba (HHJ -Instituto do Câncer de Ceará – ICC), pela oportunidade de realizar esse trabalho em tão honrosas casas.

Agradeço à minha orientadora Dra Dirce Maria Carraro-A.C.Camargo Cancer Center pela confiança, generosidade e sensibilidade em conduzir essa pesquisa com todo apoio que destinou a mim.

Agradeço à minha co-orientadora Dra Rosane Oliveira de Sant’Ana (ICC) pela dedicação e por confiar em meu potencial de forma gentil e amiga, sempre atuando firme ao meu lado.

Agradeço ao Dr. Marcos Venicius e ao Dr. Manfredo Lins (Escola Cearense de Oncologia – ECO), por estarem sempre atuantes e lutadores pela pesquisa em nosso estado.

Agradeço ao apoio que viabilizou a realização desse trabalho, em especial à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP, Governo do Estado do Ceará) e ao convênio da ECO com a Instituição UNICHRISTUS.

Agradeço às Dras Elisa Napolitano, Bruna Barros, Giovana Torrezan, Louise Danielle e Eloisa Olivieri do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do A.C.Camargo Cancer Center, a aluna Melissa Pizzi, e ao Dr. Emmanuel Dias Neto e Dr. Helano Freitas do Centro de Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center pela imensa presteza e esforço em fazerem o melhor com meus resultados.

Agradeço ao serviço de Patologia do ICC, na pessoa da Dra Patty Saldanha, que sempre se colocou disponível e interessada pela pesquisa. Aos colegas patologistas Patrocínio, Fernanda Judith, Carlos, aos técnicos do laboratório e todos que fazem essa grande família da Patologia, que tanto admiro e respeito.

Agradeço ao residente de patologia Eduardo Henrique Cunha Neves Filho e ao aluno de Iniciação Científica Luiz Vianney Saldanha Cidrão Nunes pelo imenso apoio que dispensaram a esse trabalho, com desvelo, amizade e dedicação.

Agradeço à Dra Silvia Helena Barem Raenhorst (Laboratório de Genética da Universidade Federal do Ceará- UFC) e toda equipe de seu laboratório, pela imensa ajuda e atenção com meu trabalho.

Agradeço aos colegas endoscopistas Dr. Reginaldo Costa (ICC), Dra Marília Lage Alencar e Dra Ana Elizabeth de Paiva (Hospital Geral Cesar Cals), pela disponibilidade que sempre tiveram, a paciência em participar de forma muito humana e carinhosa nesse trabalho.

Agradeço ao Dr. Paulo Goberlânio pela imensa presteza e agilidade em me orientar e ajudar nas análises estatísticas, de forma suave e amiga.

Agradeço aos amigos da Pesquisa Clínica do ICC, Dr. José Nelson Belarmino Filho e Dr. Flávio da Silveira Bitencourt, que abriram as portas em seu espaço de trabalho com simplicidade e cordialidade, sempre solícitos e gentis no trato do dia a dia.

Agradeço aos meus pais Francismar (*in memoriam*) e Socorro, por me ensinarem que os estudos com dedicação e o amor devem ser base dos nossos caminhos.

Agradeço imensamente aos pacientes e familiares que aceitaram participar desse estudo, com imensa vontade de contribuir para a pesquisa de forma enlevada e corajosa.

Agradeço a toda equipe de trabalho do Hospital Geral de Fortaleza, da PRONUTRIR e da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), que sempre se colocaram acessíveis e fraternais durante os 4 anos de trabalho.

Por fim, agradeço aos meus familiares e amigos pela força para continuar nessa jornada.

RESUMO

Pires APB. **Avaliação do perfil mutacional, expressão protéica e regressão tumoral e das características clínicas de pacientes com cânceres gástricos localmente avançados submetidos à quimioterapia perioperatória.** São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com Escola Cearense de Oncologia]

O câncer gástrico(CG) apresenta alta prevalência e letalidade no Brasil. Na abordagem da doença localmente avançado, além da cirurgia, a quimioterapia (QT) perioperatória impacta em melhores sobrevidas. Contudo, há poucos estudos com marcadores biológicos de resposta à QT. O objetivo principal desse estudo foi avaliar as taxas de regressão tumoral (TRT) à QT correlacionando-o com o perfil mutacional por sequenciamento de exoma completo (SEC) e avaliação por imunoistoquímica (IHQ) de HER-2, c-MET, CD8, CD68 e FOXP3. Amostras tumorais (AT) pré-QT foram colhidas e as peças cirúrgicas pós-QT foram classificadas quanto à TRT em respondedoras ou não (R+ e R-, respectivamente).As AT pré-QT foram submetidas a extração do DNA e 12 delas foram selecionadas para SEC, 3 do grupo R+ e 9 do R-. AT pós-QT foram avaliadas quanto à expressão de CD8, CD68, c-MET, HER-2 e FOXP3. A análise dos dados foi avaliada através do software SPSS statistics 17.0. De agosto de 2013 a dezembro de 2016, 63 pacientes foram submetidos a um estudo prospectivo não randomizado. A idade mediana foi de 62 anos (29-75 anos), com 60,3% masculinos, 57,1% com ECOG 1, localização distal em 79% e subtipo difuso em 44,4%. Os 3 ciclos iniciais de QT foram feitos por 85,7% dos casos, com 73% operados e 65,1% de cirurgias curativas. A TRT foi de 19,1%, sem invasão linfonodal em 43,9% e 92,7% de margens livres. Após a cirurgia, 46,9% dos pacientes concluíram a QT. A Sobrevida Global (SG) foi de 29,4 meses. Fatores de mau prognóstico foram disfagia, anemia e a presença de

mucosite oral à QT. Quanto à IHQ, 3 pacientes foram HER-2 positivos e 51,3% expressavam FOXP3. Pacientes com baixa expressão de CD68 e ausência de c-MET obtiveram melhores sobrevidas. O perfil mutacional mostrou 10 genes mutados exclusivos do grupo R+, 7 em comum e 26 nos pacientes R-. O gene mais frequente mutado foi *TP53*, além dos genes *MACF1*, *ARID1A*, *ERBB2* e *ALPK*, que se relacionam à integridade genômica, adesão celular e remodelamento de cromatina. Nosso estudo mostrou uma TRT e SG compatível com a literatura, sendo a expressão do MET um bom marcador prognóstico e preditivo e identificou-se genes mutados que poderão ser testados como marcadores com potencial de prever desfechos clínicos de pacientes com CG submetidos à QT perioperatória, pode aumentar as chances de cura desses pacientes.

SUMMARY

Pires APB. **[Mutation, protein expression, tumor regression and clinical profiles of patients with locally advanced gastric cancer submitted to perioperative chemotherapy]**. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com Escola Cearense de Oncologia]

Gastric cancer (GC) is highly prevalent and lethal in Brazil. In addition to surgical resection, locally advanced GC may be treated perioperatively with polychemotherapy (PP), increasing chances of cure and survival. However, few studies have evaluated biological markers of response to PP. The main purpose of this study was to correlate tumor regression rates (TRR) with mutation profile by whole exome sequencing (WES), and evaluate protein expression by immunohistochemical analysis (IA) of HER-2, c-MET, CD8, CD68 and FOXP3. At baseline, tumor samples were collected endoscopically and surgical specimens were classified according to TRR, divided into responders (R+) or G1 and non-responders (R-) or G3. The frozen samples were submitted to DNA extraction. Twelve samples (R+/G1 n=3 vs. R-/G3 n=9) were selected for WES. After the first three cycles of chemotherapy, surgical biopsy specimens were evaluated for the markers CD8, CD68, c-MET, HER-2 and FOXP3. The statistical analyses were performed with SPSS Statistics v.17.0. Between August 2013 and December 2016, clinical, pathological and IA were collected for 63 patients with locally advanced GC and submitted to a non-random prospective study. The median age was 62 years (range: 29-75), 60. 3% were males, and 57. 1% were classified as ECOG 1. Most tumors (79%) were distal, and 44.4% were of the diffuse subtype. Most patients (85.7%) completed the first three cycles, 73% were submitted to surgery, 65.1% of which was curative. The mean TRR was 19.1%, no lymph node involvement was observed in 43.9%, and 92.7% had

free margins. After surgery, 46.9% completed treatment. The median survival time was 29.4 months. Factors of poor prognosis included dysphagia, anemia and presence of oral mucositis during PP. On IA, 3 patients were HER-2-positive and 51.3% expressed FOXP3. Survival was longest for patients with low CD68 expression and absence of c-MET. Ten mutations were exclusive to the R+ group, 26 were exclusive to the R- group and 7 observed in both groups. The most frequently mutated gene was *TP53*, followed by *MACF1*, *ARID1A*, *ERBB2* and *ALPK2*, included genome integrity, cell adhesion and chromatin remodeling. Overall, TRR and survival was compatible with the literature. MET expression was shown to be a good prognostic marker, with clinical potential and it was mutated genes which might serve as molecular markers of clinical outcome in patients submitted to PP for locally advanced GC, increasing chances of cure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma de inclusão de pacientes, coleta de dados e seguimento.....	35
Figura 2	Etapas do sequenciamento do exoma completo.....	57
Figura 3	Influência do sintoma disfagia na Sobrevida Livre de Doença.....	67
Figura 4	Influência do grau de diferenciação tumoral na Sobrevida Global.....	68
Figura 5	Fotografia dos pés da paciente 36 com síndrome mão-pé grau 3 após 6º ciclo de quimioterapia (com a permissão do paciente).....	71
Figura 6	Fotografia do pé esquerdo do paciente 52, apresentando aspecto isquêmico (hiperemia com necrose ungueal) em 5º pododáctilo (com a permissão do paciente).....	72
Figura 7	Influência do intervalo QT-cirurgia na sobrevida.....	74
Figura 8	Influência da presença de cirurgia (não operados & operados) na sobrevida.....	75
Figura 9	Influência do tipo de cirurgia (total & subtotal & paliativa) na sobrevida.....	75
Figura 10	Apresentação em aumento de 10x de fotografia de resposta grau 1 (resposta patológica completa, paciente	78

25). (Laboratório de Patologia Hospital Haroldo Huaçaba (HHJ) – Fortaleza-Ce 2016).....	
Figura 11 Apresentação em aumento de 10x de resposta grau 2 (resposta parcial, paciente 9) (Laboratório de Patologia HHJ – Fortaleza CE 2016).....	78
Figura 12 Apresentação em aumento de 10x de resposta grau 3 (ausência de resposta, paciente 19) (Laboratório de Patologia HHJ – Fortaleza CE 2016).....	79
Figura 13 Influência do comprometimento das margens cirúrgicas na SLD.....	80
Figura 14 Apresentação em aumento de 10x de resultado imunoistoquímico de paciente com câncer gástrico subtipo intestinal com expressão presente e ausente de c-MET.....	82
Figura 15 Apresentação em aumento de 10x de resultado imunoistoquímico de pacientes com cânceres gástricos dos subtipo intestinal e difuso, com expressão positiva e negativa, respectivamente.....	83
Figura 16 Apresentação em aumento de 40x de resultado imunoistoquímico de paciente com câncer gástrico subtipo difuso com expressão alta e baixa dos marcadores CD8 e CD68, tanto intratumoral quanto peritumoral.....	84
Figura 17 Curva de Sobrevida Global em associação à baixa e alta expressão de CD68.....	85

Figura 18	Curva de Sobrevida Livre de Doença em associação à baixa e alta expressão de CD68.....	86
Figura 19	Curva de Sobrevida Global em associação à expressão de c-MET.....	86
Figura 20	Curva de Sobrevida Global de Kaplan-Meier de pacientes com CGLA diagnosticados e atendidos no HHJ no período de agosto de 2013 a dezembro de 2016.....	87
Figura 21	Curva de Sobrevida Livre de Doença de Kaplan-Meier de pacientes com câncer gástrico diagnosticados e atendidos no HHJ no período de agosto de 2013 a dezembro de 2016.....	87
Figura 22	Curva de Sobrevida Global em relação às taxas de regressão tumoral G1 e G2 versus G3 (respondedor e não respondedor).....	88
Figura 23	Curva de Sobrevida Livre de Doença em relação às taxas de regressão tumoral G1 e G2 versus G3 (respondedor e não respondedor).....	88
Figura 24	Diagrama de Venn mostrando os grupos de genes mutados de pacientes R+ (azul) e R-(amarelo) e os genes em comum.....	97
Figura 25	Principais genes mutados com suas funções biológicas relacionadas ao perfil de resposta tumoral encontrada em cada grupo.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características histológicas dos tecidos congelados (tumor primário e normal) da casuística e a respectiva qualidade do RNA e do DNA.....	48
Tabela 2	Características das amostras selecionadas para o estudo, de acordo com a idade, sexo, tipo histológico e resposta tumoral alcançada.....	51
Tabela 3	Pareamento das amostras selecionadas para o estudo, de acordo com o tipo histológico, localização do tumor, idade e sexo, além da resposta tumoral alcançada.....	51
Tabela 4	Perfil clínico e histopatológico de pacientes com câncer gástrico localmente avançado (CGLA).....	65
Tabela 5	Perfil sintomatológico de pacientes com CGLA.....	66
Tabela 6	Perfil nutricional inicial e <i>performance status</i> por ECOG de pacientes com CGLA.....	67
Tabela 7	Perfil laboratorial inicial de pacientes com CGLA.....	67
Tabela 8	Perfil quimioterápico e de toxicidades de pacientes com CGLA.....	70

Tabela 9	Influência do perfil de toxicidade à QT na SG e TRT.....	71
Tabela 10	Perfil de toxicidades à QT de pacientes com CGLA.....	72
Tabela 11	Perfil cirúrgico de pacientes com CGLA.....	73
Tabela 12	Perfil temporal cirúrgico e de complicações pós-operatórias de pacientes com CGLA.....	74
Tabela 13	Influência da esplenectomia na sobrevida.....	76
Tabela 14	Estadiamento patológico e gradação de regressão tumoral de pacientes com CGLA no período de agosto de 2013 a dezembro de 2016.....	77
Tabela 15	Influência do estadiamento linfonodal na sobrevida e recidiva...	79
Tabela 16	Influência da presença de invasão vascular-linfática nas taxas de regressão tumoral.....	80
Tabela 17	Perfil de tratamento e de sobrevida e recidiva dos pacientes com CGLA no período de agosto de 2013 a dezembro de 2016.....	81
Tabela 18	Perfil imunoistoquímico de pacientes com CGLA no período de agosto de 2013 a dezembro de 2016.....	82

Tabela 19	Análises multivariadas relacionando sobrevida, recidiva e regressão tumoral.....	89
Tabela 20	Cobertura de leitura das bases de cada amostra seqüenciada..	90
Tabela 21	Alterações somáticas encontradas nas amostras.....	91
Tabela 22	Genes frequentemente mutados em tumores gástricos identificados em nosso estudo.....	93
Tabela 23	Alterações encontradas no gene <i>TP53</i>	94
Tabela 24	Alterações comuns entre o grupo de amostras respondedoras.	95
Tabela 25	Genes em comum entre o grupo de amostras não respondedoras.....	96
Tabela 26	Principais genes mutados nos pacientes com CGLA dessa casuística, com seus grupos funcionais, localização cromossômica, frequência de mutação e subtipo histológico e/ou molecular relatado.....	98
Tabela 27	Genes “novos” ainda não relatados em CG previamente, descritos nessa casuística, mostrando a localização, funções biológicas conhecidas e associação com as patologias conhecidas.....	99

Tabela 28 Genes mutados encontradas no grupo de pacientes respondedores (R+) entre subtipo difuso versus intestinal..... 100

Tabela 29 Genes mutados encontradas no grupo de pacientes não respondedores (R-) entre subtipo difuso versus intestinal..... 100

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Listagem de exames laboratoriais realizados pré-tratamento.....	38
Quadro 2	Listagem de exames complementares de estadiamento e de avaliação clínica pré-tratamento.....	38
Quadro 3	Esquemas de Quimioterapia – ECX, EOX e CX (3 ciclos pré-operatórios), com os respectivos número de pacientes alocados.	39
Quadro 4	Avaliação da taxa de regressão tumoral.....	41
Quadro 5	Listagem de anticorpos e seus respectivos fabricantes, clones e concentração.....	42
Quadro 6	Padrão de expressão por imunoistoquímica para <i>HER-2</i> considerando tanto para espécimes cirúrgicas quanto para biópsias.....	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACRG	Do inglês, <i>Asian Cancer Research Group</i>
AR	Ausência de resposta
anti-CTLA4	Anticorpo anti-linfócito T citotóxico 4
anti-PD-1	Anticorpo contra morte celular programada 1
anti-PDL1/L2	Anticorpo contra ligante de morte celular programada 1 e 2
BSC	Do inglês, <i>Best supportive care</i>
CAF	Do inglês, <i>Cancer associated fibroblastic</i>
CCD	Do inglês, <i>Consensus condng DNA</i>
CG	Câncer Gástrico
CEA	Antígeno carcinoembrionário
COSMIC	Do inglês, <i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i>
CT	Células tumorais
CGLA	Câncer gástrico localmente avançado
CISH	Do inglês, <i>Chromogenic in situ hybridization</i>
CIN	Do inglês, <i>Chromosomal instability</i>
COX	Ciclooxygenase
CX	Cisplatina e xeloda
DCF	Docetaxel, cisplatina e 5-fluouoracil
DE	Doença estável
ECF	Epirrubicina, cisplatina e 5-fluouoracil
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
ECX	Epirrubicina, cisplatina e xeloda (capecitabina)
EGFR	Do inglês, <i>Epidermal growth factor receptor</i>
EOX	Epirrubicina, cisplatina e xeloda (capecitabina)
ERCC	Do inglês, <i>Excision Repair Cross Complementing</i>
FISH	Do inglês, <i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FOXP3	Do inglês, <i>Forkhead Box Protein 3</i>

GS	Do inglês, <i>Genomic stability</i>
HER-2	Do inglês, <i>Human Epidemal Growth Factor Recpetor type 2</i>
HGF	Do inglês, <i>Hepatocyte growth factor</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IHQ	Imunoistoquímica
ISP	Do inglês, <i>Ion Sphere Particle</i>
ISH	Do inglês, <i>in situ hybridization</i>
iNOS	Sintase do óxido nítrico induzível
JAK2	Do inglês, <i>Janus kinase 2</i>
JEG	Junção esôfago-gástrica
LOF	Do inglês, <i>Loss of function</i>
MACF1	Do inglês, <i>Microtubule-actin crosslinking factor 1</i>
MAF	Do inglês, <i>Minimum allele frequency</i>
MET	Do inglês, <i>Mesenchymal epidermal transition</i>
MSI	Do inglês, <i>Microsatellite instability</i>
mTOR	Do inglês, <i>Mechanistic target of rapamycin</i>
NCCN	Do inglês, <i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NGS	Do inglês, <i>Next-generation sequencing</i>
MO	Mucosite oral
PD	Progressão de doença
PELF	Platina, etoposide, ácido folínico e 5-FU
PF	Cisplatina e 5-FU em infusão contínua 5 por dias
PG	Prostaglandina
PP	Poliquimioterapia perioperatória
P. S.	Do inglês, <i>Performance status</i>
PSCA	Do inglês, <i>Prostate stem cell antigen</i>
QT	Quimioterapia
Qtad	Quimioterapia adjuvante
Qtneo	Quimioterapia neoadjuvante
RP	Remissão parcial

RPC	Resposta patológica completa
RIN	Do inglês, <i>RNA integrity number</i>
RT	Regressão tumoral
RTC	Receptor (es) tirosina cinase (s)
SG	Sobrevida Global
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SLP	Sobrevida Livre de Progressão
SNP	Do inglês, <i>Single Nucleotide Polimorphism</i>
SNV	Do inglês, <i>Single Nucleotide Variant</i>
TAM	Macrófago associado ao tumor
TCGA	Do inglês, <i>The Cancer Genome Atlas</i>
TEM	Transição epitélio-mesênquima
TG	Tumores gástricos
TILs	Do inglês, <i>Tumor infiltrating lymphocytes</i>
TLR	Do inglês, <i>Toll-like receptor</i>
TREGS	Linfócitos T reguladores
TRT	Taxa de regressão tumoral
TVC	Do inglês, <i>Torrent Variant Caller</i>
VCF	Do inglês, <i>Variante caller file</i>
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular
XELOX	Xeloda e oxaliplatina

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O câncer gástrico: aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos..	1
1.2	A cirurgia no câncer gástrico	7
1.3	Fatores prognósticos e preditivos	10
1.4	Avaliação do perfil mutacional do CG	18
1.5	A quimioterapia no CG	22
1.5.1	A quimioterapia perioperatória no CG	26
1.5.2	Avaliação da taxa de regressão tumoral	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo Primário	33
2.2	Objetivos Secundários	33
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1	Elegibilidade	36
3.1.1	CrITÉRIOS de inclusÃO	36
3.1.2	CrITÉRIOS de ExclusÃO	36
3.2	Avaliação pré-tratamento.....	37
3.3	Plano de tratamento	39
3.4	Análise histopatológica das amostras das ressecções gástricas e linfonodais	40
3.4.1	Análise da taxa de regressão tumoral	40
3.4.2	Análise imunoistoquímica	41
3.4.3	Análise molecular para identificação de biomarcador de resposta ao tratamento	45
3.5	Toxicidades, seguimento e análises de sobrevida	58
3.6	Área de intervenção geográfica e população alvo.....	60
3.7	Cálculo do tamanho da amostra e análise estatística	60
3.8	Aspectos éticos	62

4	RESULTADOS	64
5	DISCUSSÃO	101
6	CONCLUSÕES	120
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

ANEXOS

Anexo 1	Declaração de Helsinque
Anexo 2	Índice de <i>Karnofsky</i> e <i>ECOG</i> para <i>PerformanceStatus</i>
Anexo 3	Critérios de Toxicidade
Anexo 4	Consentimento pós-informado
Anexo 5	Financiamento
Anexo 6	Avaliação de regressão tumoral
Anexo 7	Níveis de evidência (<i>NCCN</i>)
Anexo 8	Ficha Clínica

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER GÁSTRICO: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E PATOLÓGICOS.

O câncer gástrico (CG) é a terceira neoplasia mais letal no mundo e, em 2015, causou cerca de 754.000 mortes (World Health Organization - WHO 2017). Representa o quinto tumor maligno mais comum em todo o mundo, com quase 1 milhão de casos novos (952.000 casos, com 6,8% do total), estando atrás apenas dos casos de câncer de pulmão, mama, colorretal e próstata (FERLAY et al. 2013). É a quarta causa de câncer em homens e a quinta causa em mulheres. Em 2013 nos Estados Unidos da América estimou-se a incidência de 21.600 novos casos e 10.990 mortes, sendo a 14^a neoplasia maligna mais comum (American Cancer Society - ACS 2016).

Em países desenvolvidos, houve uma tendência de queda na incidências do CG, com destaque aos tumores de localização distal nos últimos anos. Contudo no Brasil, a realidade denota ainda um curva ascendente. Em todo país, a estimativa de casos novos para 2016 foi de 12.920 casos em homens e 7.600 casos em mulheres, correspondendo a 13,04 casos novos por 100.000 homens e 7,37 por 100.000 mulheres. Nas regiões Norte e Nordeste esses números são mais alarmantes, sendo o segundo mais frequente em homens (Ministério da Saúde 2016). Em locais

onde existe ainda baixo desenvolvimento sócio-econômico, em especial no Estado do Ceará, estima-se que a mortalidade seja de 2 a 3 vezes maior.

Os homens são mais propensos ao desenvolvimento destes tumores, geralmente com dobro de incidência. É uma neoplasia prevalente de países em desenvolvimento e de origem asiática. Os fatores de risco são: idade avançada, tabagismo, sedentarismo, baixa condição sócio-econômica, alcoolismo, infecção por algumas cepas de *Helicobacter pylori*, infecções pelo vírus *Epstein-Baar*, metaplasia intestinal, gastrite atrófica, anemia perniciosa, pólipos adenomatosos gástricos, polipose adenomatosa familiar, doença de Ménétrier, esôfago de Barret, alimentação rica em sal e conservantes (nitritos, nitratos e defumados), presença de doença hepática alcoólica e dieta pobre em frutas e vegetais. Para os CG localizados na cárdia, obesidade, presença de esôfago de *Barret* e doença do refluxo gastro-esofágico são fatores associados (O'DOHERTY et al. 2012; TURATI et al. 2013; KARIMI et al. 2014; CHENG XY et al. 2016; DANTAS et al. 2016; HA et al. 2016; OHBA et al. 2016).

Recentemente tem-se relatado a susceptibilidade genética individual contribuindo para um maior risco de CG. Algumas variantes genéticas podem estar diretamente relacionadas às respostas do indivíduo a agressões à mucosa gástrica pela *Helicobacter pylori*, bem como à detoxicação de carcinógenos, à deficiência no reparo de danos ao DNA e à proliferação celular anômala. Variantes no gene *CDH1* (caderina 1) que afetam a função da proteína codificada, e-caderina, podem estar associadas a um alto risco para CG. Variantes nos genes *PSCA* (do inglês - *prostate*

stem cell antigen) e *MUC1* (mucina 1) denotaram risco elevado de desenvolver CG e parecem ser prevalentes nas populações orientais (SAEKI et al. 2013; KARIMI et al. 2014; LI T et al. 2014; NI et al. 2016).

Cerca de 10% dos casos de CG demonstram um padrão familiar e o risco dessa doença em parentes de primeiro e segundo grau é aumentado em 2 a 3 vezes em relação à população em geral. O câncer gástrico familiar difuso representa cerca de 1 a 3% dos casos de CG e trata-se de uma síndrome relacionada a mutação germinativa nos genes *CDH1* e *CTNNA1* (alfa-E-catenina) (FITZGERALD et al. 2010; HANSFORD et al. 2015; VAN DER POST et al. 2015). A suspeita de CG hereditário contempla os critérios abaixo relacionados:

- 1 Dois ou mais casos de CG difuso documentados em parentes de primeiro ou segundo grau, com pelo menos um diagnosticado antes dos 50 anos;
- 2 Três ou mais casos documentados de CG difuso em parentes de primeiro / segundo grau, independente da idade de início;
- 3 Diagnóstico de CG difuso com menos de 40 anos de idade;
- 4 História pessoal e/ou familiar de CG difuso ou câncer lobular de mama, sendo 1 deles com menos de 50 anos.

Outras síndromes hereditárias também presdispõe ao CG, como a Polipose Adenomatosa Familiar, Polipose Juvenil, síndrome de Lynch, Adenocarcinoma Gástrico e polipose proximal de estômago (*GAPPS*), síndrome de Li-Fraumeni e Peutz-Jeghers (VAN DER POST et al. 2015, TAN e NGEOW 2016). Os indivíduos portadores dessas síndromes hereditárias

devem ter um acompanhamento clínico particularizado, com endoscopias digestivas altas precocemente ao longo da vida, bem como avaliação para cirurgia redutora de risco, como a gastrectomia profilática.

Cerca de 95% dos casos de CG são classificados como adenocarcinomas. A classificação macroscópica comumente utilizada é através do escore de Borrmann (Borrmann 1926, citado por BAN (2011, p. 73), que varia de I a V, sendo I o subtipo polipóide, II lesão ulcerada com bordas elevadas, III lesão ulcerada infiltrando a parede gástrica, IV tumores infiltrativos difusos e V são os não classificáveis. Conforme a classificação histológica de Lauren de 1965, citado por PARK et al. (2010, p.53), os adenocarcinomas gástricos são divididos em dois diferentes tipos, ponderando-se o prognóstico, epidemiologia e a etiopatogenia: o intestinal e o difuso, além de variações ditas mistas, que podem ser com predomínio intestinal e/ou difuso. Essa divisão pondera fatores genéticos e ambientais diferenciados em cada subtipo. O tipo intestinal apresenta a tendência a formar glândulas e está fortemente associado a inflamação da mucosa gástrica (gastrite crônica, metaplasia e displasia intestinal) e a infecção crônica pelo *Helicobacter pylori*. O tipo difuso consiste em pequenas células não coesas e desorganizadas, presença de células em anel de sinete, sendo mais propício à infiltração de submucosa e à formação de metástase precocemente (TANG et al. 2013; CHEN et al. 2016).

Outras classificações foram propostas, pois se reconhece que apenas a avaliação topográfica e histológica não afere com precisão o prognóstico e

o tratamento. Assim, tem-se priorizado as análises moleculares e genômicas nas estratificações de risco.

O projeto “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) propõe uma classificação molecular do CG, que tende a superar critérios clínicos e patológicos. Atina-se que a heterogeneidade e complexidade genômica do CG determina distintas características fenotípicas. Essa classificação divide o CG em 4 subtipos, segundo Cancer Genome Atlas Research Network (2014):

- 1 Tumores infectados pelo vírus *Epstein-Barr*;
- 2 Tumores com instabilidade microssatélite (do inglês - *microsatellite instability* - MSI);
- 3 Tumores genomicamente estáveis (do inglês -*genomic stability* - GS);
- 4 Tumores cromossomicamente instáveis (do inglês -*chromosomal instability* - CIN).

O subtipo 1 ocorre em 10% dos casos e está associado à hipermetilação do DNA, à supressão imunológica, mutação somática do gene *ARID1A* e à amplificação de *JAK2* (*Janus kinase 2*). Dessa forma, estratégias terapêuticas com ação preponderantemente imunológicas, como a utilização de inibidores de “checkpoints” imunes, tais como o anti-PDL1/L2 (anticorpos contra ligantes de morte celular programada 1/2, como o atezolizumab) ou inibidor de receptores de tirosina cinase (RTC) como o sorafenib ou os bloqueadores da via mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), como o everolimus, podem ser aplicadas (DOI et al. 2010; MARTIN-RICHARD et al. 2013; JIN et al. 2016; COLLE et al. 2017).

O segundo tipo (*MSI*) está relacionado a perda de função de genes do reparo do DNA e são mais frequentemente do tipo intestinal, ocorrendo mais em pacientes idosos e mulheres. Ocorre em 8 a 37% dos pacientes e reflete um bom prognóstico com cirurgia exclusiva. Semelhante ao câncer de cólon, apresenta baixa responsividade à quimioterapia, porém com possível resposta ao anticorpo anti-CTLA 4 (*cytotoxic T lymphocytes* tipo 4, como ipilimumab) e anti-PD-1 (anticorpos contra *programmed Death 1*, como nivolumab ou pembrolizumab) (BILGIN et al. 2017).

O subtipo GS ocorrem em pacientes jovens, com tipo difuso e pode apresentar mutação dos genes *CDH1*, *RHOA* (da família RhoGTPase A) e do gene de fusão *CLN18-ARHGAP*, que se relacionam as vias de adesão celular. Incide em cerca de 30% dos casos (CHEN et al. 2016).

Os tumores com padrão *CIN* representam de 50 a 70% dos casos, apresentam mutação do *TP53* e amplificação de *RTC*. Nesse grupo prevalece a histologia intestinal (CHOI et al. 2016; CRISTESCU et al. 2016).

O CG dissemina-se por invasão linfonodal, por via hematogênica, principalmente para fígado, e por contiguidade para estruturas adjacentes e para o peritônio. As disseminações locorregionais de importância terapêutica consistem na extensão por agressão das camadas do estômago, que prediz risco de propagação para estruturas circunjacentes ou peritônio, e extensão de acometimento linfático. Observa-se também que a presença de células em anel de sinete está associado a tumores de alto grau histológico, pouco diferenciados e com tendência a margens microscópicas positivas. Através

dessas características e do grau de diferenciação, define-se o prognóstico (MARANO et al. 2015; POSTLEWAIT et al. 2015).

1.2 A CIRURGIA NO CÂNCER GÁSTRICO.

A cirurgia é o tratamento padrão com intuito curativo no CG. A extensão da gastrectomia não apresenta forte impacto com a sobrevida e morbidade, sendo a gastrectomia subtotal o procedimento de escolha, desde que garantidas as margens de ressecção (ANGELOV et al. 2016; BRENKMAN et al. 2016; KONG et al. 2016). Para os tumores do tipo difuso em pacientes com bom “performance status” recomenda-se ressecção com amplas margens, de até 8 cm (SANTORO et al. 2014).

Uma das principais controvérsias do tratamento cirúrgico reside na extensão da ressecção linfonodal. A cirurgia denominada D1 envolve a retirada de toda a lesão gástrica envolvida (gastrectomia distal ou total) junto com o pequeno e o grande omento, além da dissecação de linfonodos das estações relacionadas a essas localizações (pequena e grande curvatura, artéria gástrica direita, área suprapilórica e ao longo da área infrapilórica). Já a ressecção denominada D2, além de contemplar os linfonodos descritos na D1 (*D1 plus*), envolveria ainda a retirada do folheto anterior do mesocólon e a linfadenectomia nos pedículos vasculares gástricos (artéria gástrica esquerda, artéria hepática comum, artéria celíaca, hilo e artéria esplênica) (*National Comprehensive Cancer Network - NCCN 2017 versão 2*). A extensão da linfadenectomia correlaciona-se com redução da recorrência e

da Sobrevida Livre de Doença (SLD), sendo a linfadenectomia D2 em centros experientes considerada padrão, sem incrementos de morbimortalidade (DEGIULI et al. 2014; KODERA 2016).

Uma metanálise de cerca de 20 estudos realizados no Japão mostrou uma tendência de melhora na Sobrevida Global (SG) em subgrupo de pacientes submetidos à cirurgia D2, na ausência de esplenectomia e/ou pancreatectomia (JIANG et al. 2013). Em contrapartida, outra metanálise com mais de 1800 pacientes detectou que a gastrectomia D1 esteve associada a menos complicações pós-operatórias, com menos fístulas, menos necessidade de reoperação, menor tempo de internação hospitalar e inferiores taxa de mortalidade em 30 dias, com sobrevida de 5 anos semelhantes para D1 e D2 (MEMON et al. 2011).

Em seguimento de 15 anos, o estudo “Dutch D1D2 trial” revelou que, em centros de alto volume, a linfadenectomia D2 com preservação esplênica apresentam menores taxas de recorrência local e de mortes, comparativamente a D1 (SONGUN et al. 2010). Observa-se que essa estratégia proporciona o estadiamento adequado, aumenta a sobrevida em alguns subgrupos de pacientes (com preservação de baço e pâncreas) e não aumenta as complicações e mortalidade quando realizada por cirurgiões experientes (WU et al. 2006; DEGIULI et al. 2016; RAUSEI et al. 2016).

Destaca-se que não há ganhos de sobrevida em disseções linfonodais além da D2, como a D3 (ROGGIN e POSNER 2006; MCCULLOCH et al. 2012; MOCELLIN et al. 2015, MOCELLIN e NITTI 2015).

Existem diferenças quando se compara os centros japoneses dos demais, verificando-se melhores taxas de sobrevida e menores de morbidade obtidas com ressecções mais amplas. As razões para as discrepâncias entre os resultados dos estudos japoneses e ocidentais poderão estar relacionadas ao perfil diferenciado dessa população em relação aos não-orientais. Não se observa uma completa padronização das definições das disseções D1 e D2 nos estudos ocidentais e acredita-se que a menor faixa etária, menor incidência de comorbidades e de obesidade entre os pacientes japoneses, além de outras diferenças étnicas e biológicas, possam em conjunto assegurar melhores resultados (SANO et al. 2004; YAMAMOTO et al. 2015).

A raça também pode influenciar no prognóstico de pacientes com CG. Pacientes negros exibem com maior frequência piores prognósticos, comparativamente a brancos e asiáticos, consecutivamente. Entretanto, essas diferenças concatenam-se muito mais pela experiência cirúrgica, pelo risco de obesidade e por condições sócio-econômicas desfavoráveis nesse grupo (LUI et al. 2014; HOWARD et al. 2015).

A cirurgia curativa determina taxas de sobrevida em 5 anos que variam de 58 a 78% para estágio I e de 34% para estágio II. De forma geral, a Sobrevida Global em 5 anos para pacientes com câncer gástrico submetidos à cirurgia varia de 15 a 35%. Observa-se que 1 a cada 5 pessoas sobrevivem à doença por 5 ou mais anos, porém esse número tem triplicado nos últimos 40 anos em países desenvolvidos (WASHINGTON 2010; FERLAY et al. 2013).

1.3 FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS

Além dos fatores relacionados à extensão locorregional e aos órgãos distantes, a ressecção completa do tumor é um dos mais importantes fatores prognósticos (KIM et al. 1998; MARANO et al. 2015; ZHAO et al. 2015). Pacientes que alcançaram a citorredução completa (R0 – ausência de doença residual e margens cirúrgicas livres) têm sobrevida superior àqueles com doença residual microscópica (R1) ou macroscópica (R2) (SABESAN et al. 2015). A presença de células em anel de sinete proporciona piores sobrevidas (POSTLEWAIT et al. 2015).

Alguns fatores moleculares estão diretamente implicados na determinação prognóstica do CG. Destacam-se a expressão de HER-2 (do inglês, *Human Epidermal Growth Factor Receptor type 2*), de p53, de c-MYC, ciclo-oxigenase (COX), de c-MET (do inglês, *mesenchymal epidermal transition*), de VEGFR (do inglês, *vascular endothelial growth factor receptor*), de EGFR (do inglês, *epidermal growth factor receptor*), de ERCC1/2 (genes relacionados ao reparo do DNA por excisão de nucleotídeos), de e-caderina e do sistema imunológico, que podem atuar como preditores de resultados clínicos-patológicos.

A amplificação do gene *ERBB2*, que codifica a proteína HER-2 da família *EGFR* de receptores de membrana acoplados à tirosina cinase, é identificado como um importante fator prognóstico, sendo presente em 5 a 20% dos CG (BANG et al. 2010; GRABSCH et al. 2010; HWANG et al. 2016, KELLY e JANJIGIAN 2016). Esse gene localiza-se no éxon 32 do

cromossomo 17q12 e faz parte da família de RTC do fator de crescimento epidermal (GRAVALOS e JIMENO 2008). Esses receptores são composto de um domínio extracelular, um curto domínio transmembranar e um domínio intracelular com atividade tirosina cinase. A amplificação de *ERBB2* por *CISH* (*chromogenic in situ hybridization*) esteve patente em 16 (12,2%) de 131 portadores de adenocarcinoma gástrico e, destes, 63% apresentavam co-amplificação de topoisomerase II α (enzima capaz de clivar e religar a dupla fita de DNA, importante durante o processo de replicação no desenovelamento das fitas de DNA). Neste estudo também houve uma associação positiva entre amplificação de *ERBB2* e subtipo intestinal, bem como pior sobrevida (TANNER et al. 2005). Um estudo brasileiro analisou 221 casos de CG e constatou hiperexpressão de HER-2 em 12% dos casos por IHQ (9% com escore de 2+ e 3% com 3+) e 8% por *FISH* (do inglês, *fluorescence in situ hybridization*) (BEGNAMI et al. 2011). É amplamente recomendado realizar o teste por IHQ e, nos casos duvidosos (2+), complementar com *FISH* ou *in situ hybridization (ISH)* para os tumores gastroesofágicos avançados (BARTLEY et al. 2016). De forma geral, os tumores que hiperexpressam HER-2 tem prognóstico agravado, a maioria é do tipo intestinal, podendo ser de moderadamente a pouco diferenciado e devem ser tratados com terapia-alvo (trastuzumabe e outros) nos casos avançados (BANG et al. 2010; HE et al. 2013; JØRGENSEN et al. 2014). Portanto, o uso do trastuzumab no cenário paliativo em pacientes HER-2 é mandatório, havendo estudos em andamento no contexto neoadjuvante, bem como de outras drogas anti-HER-2.

O gene *TP53* é o mais comumente mutado em CG, estando presente entre 19 a 29% dos casos, quando avaliados por IHQ e confere pior prognóstico (BEGNAMI et al. 2005; OKI et al. 2009; AYED et al. 2014; TAHARA et al. 2016). Exerce a função de correção em erros do ciclo celular, regulação da apoptose, diferenciação celular, metabolismo energético, senescência, defesa anti-oxidante e resposta a danos ao DNA (LIU et al. 2014; LIN et al. 2015; FISCHER 2017). Esse gene localiza-se no cromossomo 17p13 e tanto ocorre no CG intestinal quanto difuso, sendo o gene mais frequentemente mutado nessa patologia. Codifica uma proteína de 53kDA, central no controle do “checkpoint” entre as fases G1 e S do ciclo celular, sendo determinante da integridade genômica. Tanto a TCGA quanto a “Asian Cancer Reseach Group” (ACRG), descreve-se a presença de mutação somática na proteína p53 como um evento de alta prevalência, presente em 50% dos CG hipermutados e em 71% dos subclassificados como *CIN*. Existem diversas anormalidades mutacionais descritas, tanto como mutações do tipo *missense*, perda de função e ganho de função (LIU et al. 2014). Embora não seja consensual, observa-se maior risco de metástases e mais droga-resistência, contudo ainda não se determinou uma melhor aplicabilidade clínica da avaliação por IHQ do p53 (GONZALEZ et al. 2016).

O c-MYC é um oncogene codificador de fatores de transcrição fundamentais na proliferação, crescimento e diferenciação celular, ocorrendo a amplificação gênica em CG de até 40% dos tumores e relaciona-se a doença mais avançada (KHALEGHIAN et al. 2015). Estudos brasileiros

apontam a desregulação do MYC como um evento importante na carcinogênese e esteve associado a piores sobrevidas (CALCAGNO et al 2013, DE SOUSA et al 2013).

É conhecida a contribuição da COX-2 na angiogênese (com aumento da expressão de VEGF – *vascular endothelial grown fator*), na produção de prostaglandina E2 (PG E2) e PGI2, conhecidas por estimularem a migração de células endoteliais e a progressão do câncer (SAUKKONEN et al. 2003; ECHIZEN et al. 2016). KAWABE et al. (2002) relatou positividade na imunohistoquímica (IHQ) em amostras tumorais entre 43 até 100% (62% em média). A expressão aumentada de COX-2 e iNOS (do inglês, *inducible nitric oxide synthase* ou sintase do óxido nítrico induzível) está associada com maior densidade vascular, maior angiogênese e linfangiogênese tumoral e pior prognóstico (TSENG et al. 2012; KARADAYI et al. 2013; HIRAHASHI et al. 2014). Em estudo feito por ALMEIDA (2007), foi demonstrado maior positividade de expressão IHQ de COX-2 nas metástases linfonodais do que em relação ao tumor primário, em amostras de 97 pacientes submetidos à gastrectomia, com destaque para subtipo difuso, sugerindo um papel desse marcador na progressão tumoral e na disseminação linfonodal. Não obstante, a pesquisa da metilação do gene de COX-2 foi associado ao subtipo intestinal em espécimes tumorais no Brasil (DE MELO et al. 2014). Outros autores demonstraram a relação direta entre expressão de COX-2 com potencial metastático, além de imunossupressão e evasão à apoptose, destacando-se vias de sinalização NOTCH 1 e NOTCH 2 favorecendo a transformação em fenótipo de transição epitélio-mesênquima (TEM) e

inflamação no microambiente tumoral (YEH et al. 2009; TSENG et al. 2012; CHENG e FAN 2013). Nesse cenário, a infecção crônica pelo *Helicobacter pylori*, dentre outros fatores mantenedores de inflamação crônica, induz ativação dos receptores *Toll-like* (TLR) e TLR/MyD88 e conserva células-tronco tumorais, que são sabidamente mais resistentes às terapias oncológicas (ECHIZEN et al. 2016).

Observa-se elevada prevalência de expressão aumentada da proteína codificada pelo gene *MET* ou *HGF* (*hepatocyte growth factor*) (YU et al. 2013; NAGATSUMA et al. 2015; FUSE et al. 2016). Esses genes ativam alvos da rapamicina (*ras sarcoma/effector of ras/mitogen activated/AKT-RAS/MAPkinase*) e *PI3k/AKT*, que induzem transformações para o fenótipo tipo TEM, viabilizando proliferação celular, motilidade celular, capacidade de invasão e angiogênese (LEE et al. 2011; PYO et al. 2016; CATENACCI et al. 2017). Dessa forma, ocorre maior agressividade tumoral, podendo refletir em menores sobrevidas aos pacientes. Atualmente, o c-MET é considerado uma estratégia terapêutica relevante em pacientes com CG metastático, porém a avaliação do status MET como fator prognóstico ainda não é consensual (YU et al. 2013; PENG et al. 2014; JIA et al. 2016). Estudos iniciais demonstram que expressão protéica positiva de MET, a despeito do pior prognóstico, apresentaram uma tendência de resposta à combinação de quimioterapia (QT) com anticorpo monoclonal inibidores dessa via, tais como rilotumumabe (ZHU et al. 2015; PYO et al. 2016).

No tocante à neoangiogênese tumoral, a superexpressão do receptor do fator de crescimento vascular (VEGFR) em CG certifica um pior

prognóstico, com mais metástases linfonodais, maiores profundidades de invasão na parede gástrica e maior acometimento vascular (PENG et al. 2012). Uma meta-análise de 20 estudos correlatando superexpressão de fator de crescimento vascular endotelial A (VEGF-A) e sobrevida de pacientes com CG, mostrou SG e SLD desfavoráveis (JI et al. 2014). O uso de drogas que bloqueiam o VEGFR aduziu, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, potencial efeito antitumoral em pacientes com CG avançado (BARZI e THARA2014; ABDEL-RAHMAN 2015; YUAN et al. 2016). Estudos de fase III sinalizaram benefício em qualidade de vida e sobrevida do anticorpo monoclonal anti-VEGFR-2 ramucirumabe em segunda linha, isoladamente ou combinado à quimioterapia, em CG avançado (FUCHS et al. 2014; WILKE et al. 2014; AL-BATRAN et al. 2016).

Estudos indicam que a expressão anômala da proteína receptora do fator de crescimento epidermal (EGFR), seja devido a deleções ou amplificações cromossômicas, também manifestam relevante papel e são prevalentes em CG (KIM et al. 2008; BIRKMAN et al. 2016). Elevados níveis da proteína são encontrados em tumores gástricos de pior prognóstico, com maiores graus de invasão de parede gástrica, com metástases linfonodais, com grau histológico 3 e do tipo difuso. Um estudo com 121 pacientes submetidos à gastrectomia, a expressão positiva de EGFR esteve presente em 33,1% dos pacientes, correspondendo negativamente com a sobrevida e estabelecendo maior infiltração de parede, com estadiamentos mais avançados (TANG et al. 2014). Em meta-análise de mais de 7000 pacientes,

a avaliação da expressão protéica do EGFR mostrou ser um biomarcador negativo em sobrevida (ZHANG Z et al. 2017).

Mutações nos genes relacionados ao reparo do DNA por excisão de nucleotídeos *ERCC1* e *ERCC2* estão implicados na resistência aos quimioterápicos baseados em platina. Pacientes tratados com platina e fluouropirimidinas e que apresentavam baixa expressão tumoral de *ERCC1* avaliada por IHQ apresentaram melhores sobrevidas do que os portadores de alta expressão em análise multivariada (WANGJ et al. 2014). Polimorfismo desses genes podem acarretar mudanças prognósticas e preditivas no tratamento do CG (LIY et al. 2013; MO et al. 2015). Duas meta-análises que avaliaram níveis elevados de expressão protéica de *ERCC1* bem como alguns polimorfismos no gene, determinaram piores resultados dos pacientes tratados com esquemas baseados em platina (MA et al. 2015; SONG et al. 2015)

A perda de expressão de e-caderina (principal proteína de membrana responsável pela formação das junções aderentes em células epiteliais) em conjunto com mudanças na transição epitélio-mesênquima (TEM) está associada um maior risco de comprometimento micrometastático linfonodal e de metástases à distância (BANIAK et al. 2016; PETROVA et al. 2016). Outrossim, ocorre menor sensibilidade das células tumorais ao tratamento (BANIAK et al. 2016). Na população asiática é considerado um forte biomarcador prognóstico (LIN et al. 2015).

Falhas do sistema imune compõe um dos pilares básicos da carcinogênese e da evolução clínica do CG. Observa-se que ocorre uma

facilitação dentro do microambiente tumoral no processo de transformação celular, mediante um desequilíbrio de forças entre os linfócitos T CD8 e células *natural killer* (anti-tumorais) contra os linfócitos pró-tumorais T reguladores (TREGS). Por consequência, acredita-se que a infiltração linfocitária se revele um marcador prognóstico e preditor terapêutico. Além disso, células dendríticas e fibroblastos associados ao câncer (*cancer-associated fibroblasts* - CAF) (YAN et al. 2015) podem modular a resposta imune tumoral. Observa-se que a distribuição de linfócitos infiltrando o tumor (*tumor infiltrating lymphocytes* – TILs) possa correlatar-se com melhores respostas ao tratamento quimioterápico (LEE JY et al. 2015). Além disso, os CAF também tendem a expressar alfa-actina do músculo liso e sua presença denota inibição da e-caderina e por consequência perda da adesão celular, com maior invasividade, além de indução de angiogênese e bloqueio aos *checkpoints* imunes (YAN et al. 2015; HU et al. 2017). A presença de macrófagos associados ao tumor (do inglês, *tumor-associated macrophages* - TAM) CD68 positivos parece ser um fator de pior prognóstico em pacientes com CG operados (PANTANO et al. 2013; FUJII et al. 2015; LI JQ et al. 2017).

O marcador *Forkhead Box Protein 3* (FOXP3), que é considerado um marcador molecular dos linfócitos TREGS (linfócitos T reguladores), pode ser um alvo crítico na homeostase imunológica, escape anti-tumoral e tolerância imune, e sua expressão tem sido estudada em modelos animais de CG (GUO et al. 2016). Entretanto, a expressão desse marcador apresenta resultados controversos em diferentes estudos. SUH et al. (2015),

avaliando pacientes com CG, encontraram que a expressão positiva intratumoral de FOXP3 por IHQ denotou menores estádios patológicos, grau tumoral, menos invasão e recorrência e melhor SG e SLD. Tais dados concordam com estudos que demonstram alta infiltração de TREGS FOXP3 positivos e melhor prognóstico (MA et al. 2014; KIM et al. 2014). Em contrapartida, outros autores observaram que pacientes com CG ressecável obtiveram maior responsividade à quimioterapia e melhor sobrevida quando apresentaram baixa infiltração de FOXP3 e alta infiltração de células dendríticas e linfócitos associados ao tumor CD3+/CD8+ (SHEN et al. 2010; LI et al. 2016). Portanto, a relevância desses marcadores ainda é uma questão a ser esclarecida. Em andamento, estudos como o KEYNOTE 012, dentre outros, com drogas que atuam em diferentes *checkpoints* imunes parecem mostrar eficácia e segurança em pacientes com CG metastático (MURO et al. 2016).

Portanto, observa-se uma ampla variedade de marcadores com papel prognóstico e terapêutico, sendo necessária validação dessas estratégias no contexto de pacientes com câncer gástrico localmente avançado (CGLA) e não metastático CGLA em tratamento perioperatório.

1.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL MUTACIONAL DO CG

Tecnologias de sequenciamento de última geração (*next-generation sequencing* - NGS), podem prover informações precisas de mutações somáticas no genoma do CG (METZKER 2010). Essa metodologia superou

o método de Sanger (*automated Sanger sequencing*) por eletroforese capilar, por conseguir gerar enormes volumes de dados em tempo substancialmente menor. Por meio dessa técnica é possível determinar diversas alterações na sequência do DNA tais como substituições nucleotídeas, pequenas deleções ou inserções. Detecção de alterações no número de cópias e rearranjos cromossômicos por dados de NGS, é um tanto mais desafiador, porém algoritmos tem sido melhorados para em condições de sequenciamento de alta cobertura esses resultados possam ser obtidos (MEYERSON et al. 2010; SUZUKI et al. 2011).

A primeira publicação para identificar mutação somática em CG, isto é mutações presentes no tumor e ausentes nas linhagens celulares constitutivas do indivíduo, foi realizada por WANG K et al. (2011), que avaliou 22 amostras tumorais e não-tumorais por sequenciamento capilar. Nesse estudo, foi identificado 20 genes determinantes do CG, dentre eles *TP53*, *PTEN*, *CTNNB1* e *ARID1A*. Esse último é um gene supressor tumoral localizado no cromossomo 1p36.11 e membro da família *SWI/SNF* (*SWItch/Sucrose Non-Fermentable*), cuja atividade de helicase e ATPase regula o processo transcricional e remodelamento da cromatina (WANG et al. 2012; IBARROLA-VILLAVA et al. 2015). Observou-se também que pacientes com mutação do gene *ARID1A* geralmente apresentam *status* p53 negativo (KATONA e RUSTGI 2017).

Em estudo feito por XU Z et al. (2014) para detecção de mutação somática em CG por NGS, usando plataforma *ION Torrent*, que utiliza a tecnologia de sequenciamento por semicondutor de íons, avaliou-se 238

amostras tumorais de CG com o painel *Ion Ampliseq* para identificar 737 locus de 45 oncogenes e genes supressores tumorais. Foi obtida em 23 de 238 amostras, a mutação no *TP53*, com outros genes em menor frequência. KANG et al. (2013), sequenciou o exoma de amostras tumorais de pacientes com CG inicial versus avançado, usando a plataforma *ION Proton*. Nesse estudo, um total de 268 genes eram comuns tanto em fases iniciais quanto avançadas, porém havia uma quantidade maior de mutações em CG avançado (3104 genes mutados contra 516 em fases precoces, respectivamente). Ademais, as mutações nos genes *DYRK3*, *GPR116*, *MCM10*, *PCDH17*, *PCDHB1*, *RHD5* e *UNC5C* estavam presentes nos tumores precoces, podendo ser implicados às fases prematuras da carcinogênese gástrica. Essa estratégia tem imenso potencial em terapias alvo-específicas.

O estudo do repertório mutacional do CG por sequenciamento do exoma pode permitir uma melhor compreensão da carcinogênese de adenomas gástrico, pode inferir perfis de droga-resistência e também orientar nas investigações de novos genes associados ao CG hereditário. Tem-se demonstrado mutações em novos genes em CG difuso hereditário, tais como os genes do receptor de insulina (*INSR*), o gene da proteína F-box (*FBXO24*) e o gene da metiltransferase *DOT1-like* (LIUY et al. 2015). O gene *INSR*, por exemplo, tem papel importante na modulação da e-caderina por glicosilação (DONNER et al. 2015; FERRER-TORRES et al. 2016).

Diferentes genes foram encontrados mutados em CG, tais como *TP53*, *PIK3CA*, *ARID1A*, *FAT4*, *MLL3*, *MML*, *PKHD1*, *CTNNB1* e *CNTN1* (WANG K

et al. 2011; ZANG et al. 2012; WANG K et al. 2014; LIN et al. 2015; LIM et al. 2016). Tais vias relacionadas à adesão celular focal e de junções aderentes e remodelamento da cromatina, mostram um importante papel na invasividade tumoral, designando novas mutações *drivers* a serem exploradas como potenciais marcadores de resposta às diversas modalidades de tratamento.

O gene *FAT4* (*atypical cadherin 4*) está implicado no processo de adesão e polarização celular. É um gene de relevância em CG e encontra-se localizado no éxon 18, cromossomo 4q28.1, fazendo parte da família das protocaderinas. Existem a descrição de vários mecanismos mutacionais para esse gene, que tem função de supressor tumoral, e em CG a maioria descrito para o subtipo intestinal moderadamente diferenciado (MARCINKEVICIUS et al. 2013; YOSHIDA et al. 2017). Apresenta uma prevalência de mutações em CG de 3,3 a 24,1% nos estudos e dentre as mutações, tanto mecanismos de metilação quanto por alterações da via de sinalização Hippo e da via Wnt são relatadas (ZANG et al. 2012; CAI et al. 2015; LIN et al. 2015).

A mutação do gene *RHOA*, embora infrequente em outros tumores, parece ter um papel crucial no CG subtipo difuso e pode representar uma arma terapêutica futura nessa histologia de prognóstico ainda tão desfavorável (KAKIUCHI et al. 2014; ZHOU et al. 2014; CHANG et al. 2016).

1.5 A QUIMIOTERAPIA NO CG

Em 2006, WAGNER et al. publicaram resultados de revisão sistemática de 27 estudos de QT em câncer gástrico avançado e/ou metastático, onde se verificou que benefício em termos de aumento de sobrevida e de qualidade de vida quando comparada com cuidados de suporte (*best supportive care* - BSC) (69% x 47% grupo controle, respectivamente; $p < 0,05$). Concluiu-se também que o tratamento combinado foi superior à monoterapia em termos de sobrevida, com HR de 0.83 (95% IC, 0.74 a 0.93; $p=0,001$), predominando os esquemas contendo 03 drogas (envolvendo cisplatina, 5-fluorouracil e antraciclina) em comparação aos com apenas 02 dessas (cisplatina e 5-fluorouracil). Nessa mesma análise, a toxicidade de esquemas contendo três drogas foi maior naqueles em que o 5-fluorouracil foi administrado em *bolus* venoso versus infusão venosa contínua protraída (mortalidade relacionada ao tratamento – PELF 3,3 x ECF 0,6%, respectivamente esquema com 5-fluorouracil (5-FU) em bolus versus infusão contínua). O esquema PELF contempla cisplatina (P), etoposide (E), ácido folínico (L) e 5-FU (F) e o ECF é composto de epirrubicina (E), cisplatina (C) e 5-FU (F). A análise de qualidade de vida também foi favorável ao esquema ECF, o que consagrou esse esquema como de referência para o tratamento do CG metastático. Os esquemas análogos ao ECF, que utilizam capecitabina em vez do F ou de oxaliplatina em vez de cisplatina, com ou sem a epirrubicina, adquiriram força nos últimos anos, devido a não inferioridade, melhor “compliance” e menores

toxicidades (CUNNINGHAM et al. 2008; WAGNER et al. 2010; IZUSHI et al. 2016).

Outras drogas, tais como irinotecano e taxanos em associação à cisplatina e 5-fluorouracil já foram avaliadas em estudos de fase II, fase III e meta-análises com taxas de resposta em torno de 27 a 56% (PETRIOLI et al. 2016; ZHANG Y et al. 2016). Dos taxanos, o docetaxel em associação à cisplatina e/ou 5-FU infusional, demonstrou taxas de resposta superiores a 50% para doença metastática (ROTH et al. 2004a e b; CHEN et al. 2013; DIGKLIA e WAGNER 2016).

Um estudo randomizado de fase III, com pacientes com CG avançado ou metastático, comparou DCF (docetaxel, cisplatina e 5-FU por 5 dias) com PF (cisplatina e 5-FU 5 por dias) e demonstrou superioridade da adição de docetaxel tanto em termos de taxas de resposta e redução do risco de morte, a despeito de elevada toxicidade (VAN CUTSEM et al. 2006).

Como forma de evitar a inconveniência e riscos do cateter venoso, e da infusão venosa contínua, além de minimizar a toxicidade da cisplatina, CUNNINGHAM et al. (2008) avaliaram, no estudo REAL-2, esquemas contendo oxaliplatina e/ou capecitabina em comparação com ECF em pacientes com doença avançada. Os autores demonstraram a não inferioridade de EOX (epirrubicina, oxaliplatina e capecitabina), ECX (epirrubicina, cisplatina, e capecitabina) e EOF (epirrubicina, oxaliplatina e 5-FU) em relação ao ECF em termos de sobrevida, com um melhor perfil de toxicidade. Uma tendência (não significativa estatisticamente) de maior

sobrevida livre de progressão (SLP), de taxa de resposta global e de SG foi observada para o esquema EOX.

Um questionamento importante foi então decidir a melhor abordagem terapêutica de pacientes com CGLA submetidos à cirurgia oncológica considerada ótima na maioria dos centros especializados. Nesse cenário, a terapia multimodal se estabelece como uma forte alternativa, dependendo do país ou continente (MERRETT et al. 2014). De forma geral para o CGLA, os protocolos podem contemplar quimioterapia neoadjuvante (QTneo - modalidade na qual toda a QT é feita antes da cirurgia), quimioterapia adjuvante (QTad - quando se faz o tratamento após a cirurgia) ou poliquimioterapia perioperatória (PP - quando ocorre em duas fases, tanto pré quanto pós-operatória) (VAN CUTSEM et al. 2016).

O principal objetivo do tratamento adjuvante consiste em eliminar doença micrometastática residual após a cirurgia, aumentando, assim, a SLD e SG. O benefício real ainda é controverso e maioria desses estudos em adjuvância valia-se de drogas com baixas taxas de resposta e com limitado número de pacientes. Em um estudo retrospectivo com 263 pacientes, observou-se que o maior impacto para a Qtad ocorreu nos tumores T3/T4 (CHEN et al. 2017). De forma geral, o tratamento adjuvante aponta modesto benefício, geralmente mais significativo em pacientes com doença avançada e jovens (MICELI et al. 2014; CHANG et al. 2017).

O estudo CLASSIC alocou 520 pacientes para tratamento adjuvante com esquema XELOX (xeloda ou capecitabina com oxaliplatina) versus observação após ressecção tipo D2 e demonstrou vantagem em SLD em 3

anos (BANG et al. 2011). Persistiram os benefícios em seguimento de 5 anos, encontrando-se SG de 78% no grupo tratado contra 69% no grupo controle (NOH et al. 2014). Outro estudo japonês com a droga oral S-1 por 1 ano, evidenciou ganho significativo em 3 anos (81% *versus* 71%, $p=0,002$, grupo QT *versus* observação) (SAKURAMOTO et al. 2007). Existe um benefício especialmente em SLD, porém ainda não é consensual, bem como não se sabe qual o melhor esquema e índice terapêutico eficaz (MICELI et al. 2014; YANG et al. 2016).

Diversos regimes já foram proposto para o tratamento adjuvante, com drogas mais tóxicas, porém na atualidade opta-se por regimes com as fluoropirimidas (orais ou em infusão contínua), platinas (oxaliplatina ou cisplatina), com ou sem as antraciclinas e a droga S1. Essa estratégia tem sido aplicada mais frequentemente em populações orientais (FOO e LEONG 2014; IACOVELLI et al. 2016; TAKAGI et al. 2016).

Em 2001, MACDONALD et al. publicaram um estudo multicêntrico, randomizado, o “Intergroup Trial”, que envolvia 556 pacientes, numa comparação entre cirurgia seguida por radioquimioterapia à base de 5-FU *versus* cirurgia seguida por observação. O estudo demonstrou benefício estatisticamente significativo em termos de sobrevida em favor do braço que recebeu tratamento adjuvante sobre o grupo submetido somente à cirurgia (sobrevida mediana de 36 meses para radioquimioterapia *versus* 27 meses para cirurgia exclusiva, $p=0,005$). Esse benefício se estendeu a todos os grupos de pacientes, independente de estágio T ou N, dissecação D1 ou D2, exceto para histologia difusa, predominante em mulheres (análise de

subgrupo) (MACDONALD et al. 2009). O maior benefício aplicou-se ao controle locorregional, haja vista a maior incidência de metastases à distância no grupo submetido à radioquimioterapia. Desde então, implementou-se de rotina para tumores gástricos operados, estádios pT3-T4 e/ou linfonodos positivos, o protocolo “Macdonald”. Críticas a esse estudo atribuí-se ao esquema quimioterápico adotado (considerado inferior apenas 5-FU e ácido fólico em *bolus*), à citorredução cirúrgica subótima, às variações das técnicas de radioterapia utilizadas e à toxicidade apresentada no trabalho. A atualização de 10 anos de seguimento mediano reiterou manutenção do benefício da radioquimioterapia em termos de SG (HR=1,32; p=0,004) e SLD (HR=1,51; p<0,001), porém são poucos os estudos prospectivos que embasem melhor essa estratégia (MACDONALD et al. 2009; SMALLEY et al. 2012; AGOLLI et al. 2016, ZHOU et al. 2016).

1.5.1 A quimioterapia perioperatória no CG

A experiência em Qtad em CG remota os anos 70, e diversas metanálises tem ratificado a importância do tratamento adjuvante (quimioterapia e/ou radioterapia), embora exista uma tendência de superioridade do tratamento neoadjuvante ou perioperatório (OHRI et al. 2013; IACOVELLI et al. 2016; YANG et al. 2016; ZHAO et al. 2016).

Considerando que a ressecção cirúrgica ainda é o principal fator que influencia a sobrevida em CGLA, a busca pela ressecção R0 é considerado o maior objetivo do tratamento desses pacientes. Nesse âmbito, a PP, que é

considerada padrão na Europa, impõe-se como uma opção com diversas vantagens, abaixo descritas:

- 1 reduzir o volume tumoral possibilitando uma ressecção R0;
- 2 tratar doença micrometastática precocemente, impedindo a evolução das mesmas no intervalo de tempo necessário para a recuperação da cirurgia;
- 3 permitir avaliação prognóstica por meio da mensuração da resposta patológica tumoral e eventual avaliação do perfil molecular e genético tumoral,
- 4 selecionar esquemas terapêuticos com maior chance de sucesso e com menor toxicidade
- 5 identificar pacientes com tumores rapidamente progressivos durante a QT, portanto, sem ganhos com procedimento cirúrgico mutilante, mórbido e ineficaz.
- 6 tratar os pacientes ainda com “performance status” (*P.S.*) adequados antes da cirurgia pela ausência das disfunções metabólicas próprias do pós-operatório.

Os esquemas de poliquimioterapia normalmente utilizados com maiores taxas de resposta também apresentam maior toxicidade, o que pode ser um problema para pacientes debilitados pelo estresse cirúrgico, quando submetidos ao tratamento pós-cirúrgico ou adjuvante. Outra importante vantagem da utilização da quimioterapia antes da cirurgia seria uma possível substituição precoce do mesmo nos casos de ausência de resposta (AR) ou progressão de doença (PD). Tais oportunidades não são possíveis no

contexto de um tratamento adjuvante (YCHOU et al. 2011; FUJITANI et al. 2012; LUTZ et al. 2012; FITZGERALD et al. 2017).

Alguns estudos destacados demonstraram impacto positivo em termos de SG, taxas de ressecabilidade e SLD (CUNNINGHAM et al. 2006; YCHOU et al. 2011). Em meta-análise comparando-se cirurgia apenas versus PP versus QTad, observou-se que os pacientes tratados com PP obtiveram maior SLP e menor risco de metástases (YANG et al. 2016).

Muitos estudos que avaliam fatores preditivos e prognóstico com a PP são retrospectivos e com número limitado de pacientes (FUJITANI et al. 2012; LORENZEN et al. 2012; KOH et al. 2013). Concebe-se que fatores de resposta à PP significantes sejam a localização do tumor, o grau de regressão histopatológica (taxa de regressão tumoral - TRT), presença de invasão angiolinfovascular, perineural e presença de células em anel de sinete (JHAWA et al. 2009; DAVIES et al. 2014; HEGER et al. 2014).

Um notável estudo com 850 pacientes poderou os fatores prognóstico de resposta à PP em pacientes com CG (SCHMIDT et al. 2014). O grau de regressão histopatológica foi considerado um importante fator prognóstico, com sobrevida mediana de 92,2 meses para pacientes com resposta grau 1 versus 27,9 meses para pacientes sem resposta ($p < 0,001$), utilizando a classificação de BECKER et al. (2003). Esse mesmo grau também foi correlacionado com classificação de Lauren pré-cirurgia e constatou-se também prognóstico mais favorável em pacientes avaliados como respondedores ($p < 0,001$), bem como um pior prognóstico para os pacientes

com a presença versus ausência de células em anel de sinete (27,6 meses versus 46,4 meses , $p<0,001$).

Uma série de estudos fase II de QTneo comprovou que tal abordagem envolvendo esquemas com drogas como etoposídeo, cisplatina e 5-fluorouracil são bem tolerados. Uma análise dos pacientes desses estudos verificou uma forte correlação entre o grau de resposta e a sobrevida. Aproximadamente 73% dos pacientes foram submetidos à cirurgia curativa, sendo que 26% desses obtiveram resposta patológica, com sobrevida em 5 anos de 82% (sobrevida de 32% para pacientes com resposta menor ou ausência de resposta). Tal análise identificou a resposta à QTneo como preditor de melhor sobrevida (AJANI et al. 1999; LOWY et al. 1999; NEWTON et al. 2015; ZHAO et al. 2016).

Um estudo britânico, prospectivo, de fase III (“MAGIC Trial”) randomizou 503 pacientes com tumores de JEG, estômago e esôfago distal para quimioterapia com esquema ECF (03 ciclos antes e 03 ciclos após a cirurgia) ou cirurgia apenas (CUNNINGHAM et al. 2006). A PP proporcionou um “downstaging” em relação a grupo controle, tanto no diâmetro mediano da lesão primária, como no comprometimento nodal. Aproximadamente 91% dos pacientes submetidos à PP realizaram cirurgia (79% considerada curativa pelo cirurgião e 18% de cirurgia paliativa), mesmo os que não concluíram a QT; e no grupo controle 96% foram operados e desses, apenas 70% tiveram o procedimento considerado curativo (9% a menos que no grupo experimental, $p=0,03$), com 28% de cirurgias paliativas. Não transcorreu diferenças entre os grupos no que tange à morbidade (45 x 45%)

e mortalidade em 30 dias (5,6 x 5,9%) pós-operatórias, bem como no tempo de internação (13 dias). A PP também propiciou melhora vultosa na SG em 5 anos (36 % no grupo da QT x 23% no grupo da cirurgia isolada, $p= 0,009$) e na SLP (14,4% de recidiva no grupo da QT e 20,6% no da cirurgia isolada). Dos 237 pacientes randomizados para QT 22 não completaram 3 ciclos (12 por toxicidade, 3 por recusa própria, 3 por problemas com cateter 2 por óbito relacionado ao câncer e 2 por causas não especificadas). Após a cirurgia a principal causa de não realização da QT foi PD (37 pacientes), sendo somente 3 por toxicidade direta da QT.

As taxas de regressão tumoral em pacientes tratados com PP em geral ainda são modestas. Um estudo alcançou 17% de respostas maiores e definiu benefício em SLD para os pacientes que completaram os 6 ciclos de QT. Não houve ganhos para os pacientes com estadiamento yT3-4 ou com mais de 4 linfonodos comprometidos após a PP (MINGOLL et al. 2015).

Estudo clínico envolvendo 224 pacientes randomizados para PP contendo cisplatinae 5-FU (esquema PF) ou cirurgia exclusiva, demonstrou que houve melhores taxas de ressecabilidade (ressecção R0 87 x 74%, $p=0,04$) e SLD em seguimento de 5,7 anos (34% QT x 21% cirurgia, $p= 0,0033$) no grupo da QT (BOIGE et al. 2007).

Algumas metanálises afirmam aumento de SG de 19% e absoluto de SG 5 a 9% em pacientes tratados com PP, comparada à cirurgia isolada, além da melhora da SLD e das metástases à distância (ULRICH et al. 2013; XU et al. 2014; ZHAO et al. 2016). Alguns subgrupos exibem benefício majorado, especialmente os estágios mais avançados, sem incrementos em

morbimortalidade cirúrgica, quando se realiza preservação esplênica. Existe uma grande variabilidade em termos de taxas de resposta objetiva (resposta completa e parcial), com uma mediana de 43%. Outro dado relevante é que a PP parecer ser superior à estratégia neoadjuvante ou adjuvante utilizadas isoladamente (XIONG et al. 2014; YANG et al. 2015).

1.5.2 Avaliação da taxa de regressão tumoral

Diferentemente de outros tumores, tais como mama, reto e esôfago, estudos sobre regressão tumoral pós-QTneo como marcador prognóstico ainda são incipientes em CG. Acredita-se que os pacientes que obtiveram resposta patológica completa (RPc) após QTneo apresentem melhores sobrevidas, como relatado por BECKER et al. (2003, 2011), em conjunto com outros parâmetro,tais com invasão vascular e tamanho do tumor. Outros autores, entretanto, obtiveram resultados controversos. SMYTH et al. (2016) utilizando a classificação de resposta de MANDARD et al. (1994) não demonstrou impacto em sobrevida nos pacientes com melhores respostas, sendo apenas *status* nodal o único marcador prognóstico em pacientes tratado com PP.

Observa-se discrepantes taxas de RPc entre os estudos, podendo ser decorrentes da heterogeneidade dos grupos, das classificações utilizadas e dos diferentes esquemas de tratamento (MANSOUR et al. 2007; SCHMIDT et al. 2014; MARTIN-ROMANO et al. 2016; MINGOLL et al. 2015).

Não há uma padronização nas formas de avaliação das TRT, em geral com dados extrapolados de outras patologias de comportamentos

biológicos distintos (THIES e LANGER 2003; NEVES FILHO et al. 2017). Dessa maneira, os estudos são de difícil comparação, muitos deles retrospectivos. Mesmo assim, essa informação pode inferir sobre quimiosensibilidade *in vivo*, e também, orientar o tratamento pós-operatório, trazendo informações prognósticas, separando pacientes respondedores (R+) e não-respondedores (R-), aliado ao uso de marcadores genéticos, moleculares e imunoistoquímicos.

Pode-se afirmar então que quimioterapia perioperatória adicionada a avaliação da regressão tumoral é uma importante estratégia de tratamento. E nesse complexo cenário de pacientes, com heterogeneidade molecular e genômica, estudar o perfil de mutações e de marcadores imunoistoquímicos com potencial resposta à QT, impõe-se como forte estratégia de tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar o perfil mutacional e de expressão protéica e associar os resultados à taxa de regressão tumoral obtida após tratamento de pacientes com diagnóstico de CG localmente avançado e ressecável com quimioterapia contendo epirrubicina, cisplatina e/ou oxaliplatina e capecitabina.

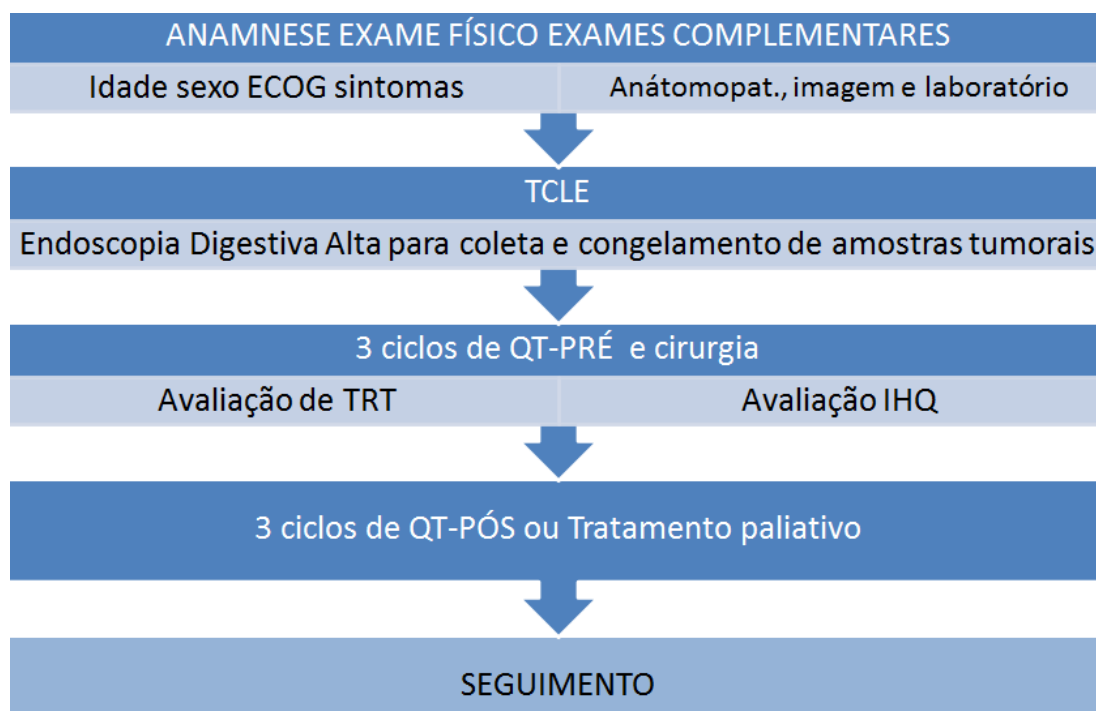
2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- 1 Determinar a taxa de Sobrevida Global, Sobrevida Livre de Doença e de cirurgia R0;
- 2 Correlacionar a taxa de resposta patológica completa e parcial obtida com a sobrevida;
- 3 Determinar a tolerância e viabilidade dos esquemas CX, ECX e EOX, em termos de toxicidade, morbidade, mortalidade cirúrgica e aderência nesse contexto;
- 4 Caracterizar o perfil mutacional dos tumores gástricos de pacientes respondedores (R+) e não respondedores (R-).
- 5 Determinar a expressão imunoistoquímica de HER-2 e c-Met nas amostras de câncer gástrico, correlacionando com sobrevida.

- 6 Avaliar a resposta imune tumoral por meio da expressão protéica de CD68, CD8 e FOXP3, correlacionando-os aos graus de regressão tumoral e sobrevida.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo do tipo fase II, prospectivo, não randomizado, envolvendo pacientes com câncer gástrico, admitidos para tratamento cirúrgico curativo no HHJ (HHJ) e Hospital Geral de Fortaleza (HGF). De agosto de 2013 a dezembro de 2016 foram alocados 63 pacientes portadores de CGLA. Esses pacientes foram avaliados pelas equipes cirúrgicas inicialmente e encaminhados para o Serviço de Oncologia Clínica, conforme Figura 1. Desses pacientes 1 foi excluído após a revisão anatomopatológica, por se tratar de um carcinoma de células escamosas.



*ECOG *Eastern Cooperative Oncology Group***Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Figura 1 - Fluxograma de inclusão dos pacientes, da coleta de dados e do seguimento.

Coletou-se por endoscopia digestiva alta (EDA) 52 amostras tumorais e não tumorais pré-tratamento, realizando-se a coleta de 6 a 8 amostras do tumor e 1 a 3 de mucosa normal, distando cerca de 3 cm da lesão principal. A EDA foi realizada pelos endoscopistas alocados para o estudo (Dr. Reginaldo Costa, Dra Ana Elizabeth de Paiva e Dra Marília Alencar). Essas amostras foram transportadas em gelo seco para o biobanco do ICC.

3.1 ELEGIBILIDADE

3.1.1 Critérios de inclusão

- ☐ Pacientes com diagnóstico histopatológico de carcinoma ou adenocarcinoma de estômago localmente avançado, ressecável, sem tratamento oncológico prévio.
- ☐ *Performance status* por ECOG entre 0 e 2 (ANEXO 2)
- ☐ Interesse voluntário em participar confirmado pela assinatura do Consentimento Esclarecido

3.1.2 Critérios de Exclusão

- ☐ Pacientes menores de 18 anos e maiores de 75 anos.
- ☐ Diagnóstico de outra neoplasia maligna em atividade (exceto Carcinoma Basocelular de pele)
- ☐ Doença sistêmica grave que na opinião do investigador possa interferir no andamento do tratamento e/ou dos seus efeitos colaterais

- ☐ Incapacidade de receber alimentos e/ou medicamentos por via oral ou enteral;
- ☐ Diagnóstico de metástases à distância pelos exames complementares.
- ☐ Hipersensibilidade aos componentes do tratamento
- ☐ Radioterapia intestinal prévia ou previsão de tratamento com irradiação durante a quimioterapia
- ☐ Quimioterapia prévia para câncer gástrico
- ☐ Gravidez
- ☐ Participação em outro estudo de intervenção.
- ☐ Estado ou patologia mental que inviabilize a capacidade do paciente de compreender e decidir os procedimentos próprios do estudo.

3.2 AVALIAÇÃO PRÉ-TRATAMENTO

Os pacientes elegíveis assinaram termo de consentimento pós-informado (Anexo 4) após a leitura e esclarecimento do mesmo. Foi realizada anamnese e exame físico colhidos pelo investigador no prazo de duas semanas que antecederam o início do tratamento, além da avaliação da doença pré-tratamento (por meio de estadiamento clínico e radiológico).

Foram colhidos exames laboratoriais até 7 dias antes do início do primeiro ciclo de quimioterapia, objetivando determinar a viabilidade de reserva hematológica, renal e hepática necessária para o tratamento, conforme Quadro 1. Além disso, colheu-se o marcador tumoral antígeno

carcinoembrionário (CEA), para posteriores avaliações de tratamento e seguimento, em caso de valores acima da normalidade.

Quadro 1 - Listagem de exames laboratoriais realizados pré-tratamento

Hemograma Completo	Bilirrubina Total e Frações
Uréia/ Creatinina	Fosfatase alcalina
Sódio/ Potássio	TGO/ TGP
Cálcio iônico	Tempo de Protrombina (TAP)
Albumina	beta-HCG (se aplicável)
CEA sérico (marcador tumoral)	Glicemia

Os exames abaixo foram feitos no prazo de até 1 mês antes do início do primeiro ciclo de quimioterapia:

Quadro 2 - Listagem de exames complementares de estadiamento e de avaliação clínica pré-tratamento.

Radiografia de tórax – estadiamento (caso anormalidades relevantes, tomografia computadorizada de tórax ou em tumores de JEG)
Tomografias computadorizadas de abdome e pelve (estadiamento – ver <i>NCCN</i>);
ECG ou ecocardiograma transtorácico (avaliação de função miocárdica padrão antes da quimioterapia com epirrubicina)
Endoscopia digestiva alta (EDA) com coleta de amostra tumoral para análise molecular subsequente (ver objetivos)
Cintilografia óssea (se suspeita de metástase óssea)
Tomografia Computadorizada de crânio ou Ressonância Magnética de crânio (se suspeita de metástase cerebral)

Todos esses exames (com exceção da repetição da EDA supracitada, que foi imprescindível para coleta de amostras de mucosa gástrica tumoral e normal), já são rotineiramente efetuados para os pacientes potencialmente candidatos ao tratamento perioperatório. Ademais, para alguns pacientes

com tumores proximais ou com obstrução alta, a segunda endoscopia foi necessária para a passagem de sonda nasoenteral, que foi utilizada tanto como via alimentar quanto para administrar as medicações de suporte e a quimioterapia oral que faz parte do esquema terapêutico.

3.3 PLANO DE TRATAMENTO

Segue no Quadro 3 os esquemas de tratamento realizados pelos pacientes.

Quadro 3 - Esquemas de Quimioterapia – ECX, EOX e CX (3 ciclos pré-operatórios), com os respectivos número de pacientes alocados.

ECX n =51	Epirrubicina 50 mg/m ² EV em bolus no D1 Cisplatina 60 mg/m ² EV em 1 a 2h no D1 Capecitabina 1250mg/m ² em 2 tomadas por 21dias.
EOX n = 4	Epirrubicina 50 mg/m ² EV em bolus no D1 Oxaliplatina 130mg/m ² em 2 horas no D1 Capecitabina 1250mg/m ² em 2 tomadas por 21dias.
CX n = 8	Cisplatina 60 mg/m ² EV em 1 a 2h no D1 Capecitabina 1250mg/m ² em 2 tomadas por 21dias.

✓ Tratamento de Suporte

Foi fornecido ao paciente do estudo o tratamento profilático para prevenção de náuseas e vômitos, e também de nefrotoxicidade por meio de hidratação venosa vigorosa pré e pós-QT no primeiro dia de cada ciclo de quimioterapia. O uso de fatores de crescimento hematopoiético (filgrastim ou eritropetina recombinante humana) foi indicado conforme diretrizes da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (do inglês, *American Society of*

Clinical Oncology - ASCO), adotadas de rotina em ambos os Serviços (profilaxia secundária nos casos de neutropenia graus 3 ou 4 e/ou neutropenia febril e tratamento de anemias secundárias à QT).

Cirurgia (após 3 ciclos de quimioterapia):

Gastrectomia total ou subtotal

Linfadenectomia D2

Quimioterapia adjuvante

Três ciclos ECX ou EOX ou CX após a cirurgia, conforme já descritos anteriormente.

3.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DAS AMOSTRAS DAS RESSECÇÕES GÁSTRICAS E LINFONODAIS

A avaliação de resposta foi realizada por meio de achados cirúrgicos à laparotomiaexploradora e pela ressecabilidade do tumor. A resposta aos 3 ciclos pré-operatórios foi analisada por meio da histopatologia, onde se avaliou a extensão da lesão primária, do comprometimento linfonodal locorregional e das margens de ressecção, realizando-se também a classificação de Becker et al (2003) para regressão tumoral.

3.4.1 Análise da taxa de regressão tumoral

Foi realizada classificação das peças cirúrgicas quanto à taxa de regressão tumoral em grau 1 (ausência de tumor ou menos de 10% de células tumorais, resposta patológica completa - RPc), grau 2 (entre 10 a

50% de células tumorais, remissão parcial – RP) e grau 3 (mais de 50% de células tumorais ou ausência de resposta – AR) (BECKER et al. 2003, 2011). Pacientes Grau 1 e grau 2 (este último apenas nos casos T1/T2, com ausência de comprometimento linfonodal) foram classificados como respondedores (R+). Os pacientes classificados como grau 2, que o estadiamento denotasse um T3 ou com linfonodos positivos, e todos os grau 3 foram classificados como não respondedores (R-). O quadro 4 demonstra a avaliação da taxa de regressão tumoral.

Quadro 4 – Avaliação da taxa de regressão tumoral.

Grau 1	ausência de tumor ou menos de 10% de células tumorais - resposta patológica completa - RPc
R+	
Grau 2	entre 10 a 50% de células tumorais - remissão parcial – RP
R+	
Grau 3	> de 50% de células tumorais ou ausência de resposta – AR
R-	

3.4.2 Análise imunoistoquímica

Amostras de biópsia cirúrgica (em casos inoperáveis ou com metástases vistas no ato cirúrgico) e de gastrectomia curativa foram testadas quanto à expressão dos marcadores imunoistoquímicos CD8, CD68, c-MET, HER-2 e FOXP3. Secções histológicas de adenocarcinoma

gástrico, previamente fixado em formol tamponado e incluído em parafina, foram montadas em lâminas silanizadas. As reações imunoistoquímicas para detecção de CD8, CD68, HER-2 e FOXP3 foram automatizadas no Auto Stainer (DAKO™). A etapa de reativação antigênica foi processada no sistema PT-Link (DAKO™) com o sistema de amplificação FLEX Plus (DAKO™). Foram utilizados controles positivos e negativos internos e externos das reações. A imunoistoquímica para detecção de c-MET foi realizada de forma manual, conforme descrição adiante. No Quadro 5 demonstram-se os anticorpos utilizados com seus fabricantes, clones e concentração.

Quadro 5 - Listagem de anticorpos e seus respectivos fabricantes, clones e concentração.

Anticorpo	Fabricante	Clone	Concentração
FOXP3	ABCAM	236A/E7 (ABCAM™)	1:300
erbB2	DAKO	<i>Polyclonal Rabbit Anti-Human cerbB-2 Oncoprotein</i>	Kit DAKO ready for use
c-MET	Cell Signaling Technology	<i>(D1C2) XP®Rabbit mAb</i>	1:350
CD8	DAKO	<i>C8/144B</i>	Kit DAKO ready for use
CD68	DAKO	<i>KP1</i>	Kit DAKO ready for use

A expressão de HER-2 foi verificada através de IHQ e hibridização *in situ* cromogênica (CISH) (quando aplicável), sendo aplicados os critérios definidos pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) para avaliação da positividade. Todas as reações imunoistoquímicas foram automatizadas no Auto Stainer (DAKO™). Foi utilizado o anticorpo Polyclonal Rabbit Anti-Human cerbB-2 Oncoprotein (DAKO™). A etapa de reativação antigênica foi

processada no sistema PT-Link (DAKO™) com o sistema de amplificação FLEX Plus (DAKO™). Os tempos de incubação seguiram indicações do fabricante. A análise das lâminas foi realizada de forma visual utilizando os sistemas de escore padronizado para interpretação, considerando os seguintes escores aplicáveis para carcinoma gástrico, seguindo os escores preconizados por BANG et al. (2010) e reproduzidos no *guideline NCCN* versão 2017. 2, demonstrado no quadro 6:

Quadro 6 - Padrão de expressão por imunoistoquímica para HER-2 considerando tanto para espécimes cirúrgicas quanto para biópsias.

	Padrão de expressão em espécimes cirúrgicas	Padrão de expressão em espécimes de biópsias	Resultados
0	Ausência de coloração ou reatividade membranosa em < 10% das células	Nenhuma reatividade ou reatividade não membranosa em qualquer percentagem celular	Negativo
1+	Coloração fraca ou incompleta da membrana em > de 10 % das células	Agrupamentos de células com fraca ou incompleta coloração membranosa perceptível	Negativo
2+	Coloração fraca a moderada em toda a circunferência da membrana celular ou em pelo menos 10% das células neoplásicas coloração basolateral ou lateral da membrana	Agrupamentos de células com fraca a moderada coloração membranosa lateral, basolateral ou completa	Duvidoso*
3+	Coloração intensa e uniforme de toda a circunferência da membrana em mais de 10% das células neoplásicas.	Agrupamento de cinco ou mais células com forte coloração membranosa lateral, basolateral ou completa	Positivo

* Os casos duvidosos foram, em sequência, avaliados por *FISH* ou *ISH*

A expressão da proteína MET foi avaliada, centralmente, por IHQ e classificada de acordo com a intensidade da coloração (fraca, moderada e forte) e a porcentagem de células coradas. Foram consideradas amostras

positivas se a maioria ($\geq 50\%$) das células tumorais apresentassem coloração de membrana e/ou citoplasma fraca (1+), moderada (2+) ou forte (3+), e consideradas negativas as amostras com $<50\%$ das células tumorais coradas. As lâminas foram desparafinizadas e hidratadas e foi realizada a recuperação antigênica em tampão citrato 10mM, pH 6,0, por 3 minutos e 40 segundos na Pascal. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10V, por 10 minutos. Sucedeu-se então o processo de incubação em câmara úmida *overnight* a 4°C com o anticorpo primário Met (D1C2) XP®Rabbit mAb (diluição 1:300; Cell Signaling Technology). A reação foi detectada com o kit comercial *MACH4 Universal*-sistema de detecção HRP-polímero (*Biocare Medical*), de acordo com as recomendações do fabricante. Por meio de microscopia de luz direta, fez-se a análise imunoistoquímica, (ANDERSON et al. 2006; XU Y et al. 2015).

A identificação de TAMs, linfócitos T e de células TREGs no estroma tumoral foi realizada por meio de expressão de CD68, CD8 e de FOXP3, respectivamente. A quantificação das células foi feita em dez campos de grande aumento (10 CGA, com magnificação de 400x), considerando-se a estratificação dos casos em grupos percentuais para análise estatística, com um *cut off* acima de 100 células para alta expressão dos marcadores CD8 e CD68. A caracterização do infiltrado inflamatório foi feita pela avaliação da expressão de marcadores de células T (CD8) e macrófago (CD68), quantificando infiltrado peri e intratumoral (CD8p, CD8i, CD68p, CD68i, respectivamente), esses quando do material de gastrectomia. Na avaliação, cinco campos de grande aumento não contíguos foram fotografados e a

contagem das células inflamatórias positivas foi realizada nas fotomicrografias manualmente usando o software *IMAGE J1.46r* e a média aritmética desses campos foi utilizada para fins de análise. Quanto ao anticorpo FOXP3, a análise das lâminas foi realizada de forma visual, sendo consideradas positivas para FOXP3 as amostras cujas células tumorais apresentaram imunorreatividade em pelo menos 20% dos núcleos (JUNG-HO et al. 2015).

3.4.3 Análise molecular para identificação de biomarcador de resposta ao tratamento

Foram coletados e congelados a -70° , os tecidos de 52 pacientes (tumor e mucosa normal) no Instituto do Câncer do Ceará e enviadas para o Banco de Macromoléculas do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center.

De cada paciente foram coletadas antes do início do tratamento por endoscopia digestiva alta 6 a 8 amostras da lesão tumoral principal e 1 a 3 amostras de mucosa normal à distância de aproximadamente 3 cm do tumor. Das amostras de tecido neoplásico, uma parte foi mantida em formol tamponado e as demais foram armazenadas em nitrogênio líquido. Imediatamente antes de armazenar o material, todas as amostras foram revistas por patologistas qualificados do ICC-HHJ e submetidas à semi-microdissecção para garantia da homogeneidade do material. Tais amostras tumorais foram avaliadas para representar tecido doente, livre de processo inflamatório, tecido não-neoplásico, fibrose, tecido adiposo ou outros contaminantes. Esses critérios também foram discutidos e uniformizados

entre os patologistas envolvidos (Dra Patty Saldanha, Dra Maria do Patrocínio e Dra Fernanda Judith, do ICC).

✓ **Processamento do tecido congelado, extração e avaliação de qualidade das moléculas**

Todos os tecidos congelados seguiram o padrão utilizado Banco de Macromoléculas do A.C.Camargo Cancer Center. As amostras seguiram os Protocolos Operacionais Padrões sendo primeiramente submetidos a uma segunda avaliação histológica detalhada pela patologista Dra. Maria Dirlei F. S. Begnami- A.C.Camargo Cancer Center. Secções de cortes histológicos dos tumores foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E) para confirmação de diagnóstico e seleção do tecido de interesse. Os tecidos foram submetidos à dissecação manual, quando necessária, para garantia da homogeneidade do material e exclusão de infiltrado inflamatório, necrose A.C.Camargo Cancer Center.

A extração do DNA foi realizada com método fenol/clorofórmio de acordo com o protocolo operacional padrão do Banco de Macromoléculas. A pureza do DNA foi avaliada pelo equipamento Nanodrop TM ND-1000 (Thermo Scientific) e a concentração pelo equipamento Qubit 2. 0 Fluorometer (Invitrogen) que mede a quantidade de DNA dupla fita na amostra através do sistema fluorimétrico. A integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR-Safe DNA gel stain (Life Technologies). O DNA genômico foi classificado como: excelente (presença de banda de alto peso molecular de aproximadamente 23kb), ótima (presença da banda de alto peso molecular > 15kb com leve rastro

abaixo dela), bom (sem banda e com rastro de DNA genômico $> 5\text{kb}$) e degradado (sem banda e com rastro de DNA genômico $< 5\text{kb}$). Os resultados de qualidade do DNA estão apresentados na Tabela 1.

Os resultados referentes a qualidade e quantidade das moléculas estão apresentados em seguida (Tabela 1).

Tabela 1 - Características histológicas dos tecidos congelados (tumor primário e normal) da casuística e a respectiva qualidade do RNA e do DNA.

ID paciente	TECIDO TUMORAL					TECIDO NORMAL		
	Tipo histológico	Classificação tumor	% células	Qualidade DNA	Rend. DNA	% células	Qualidade DNA	Rend. DNA
DG1	Carcinoma	Difuso	90%	Ótima	35,4	100%	Excelente	40,0
DG2	Carcinoma	Difuso	95%	Ótima	33,4	100%	Excelente	32,2
DG3	Carcinoma	Difuso	100%	Ótima	43,6	100%	Ótima	49,2
DG4	Necrose	/-/	/-/	/-/	/-/	/-/	/-/	/-/
DG5	Adenocarcinoma	Intestinal	50%	/-/	/-/	/-/	/-/	/-/
DG6	**	/-/	/-/	/-/	/-/	/-/	/-/	/-/
DG7	Adenocarcinoma	Difuso	100%	Boa	27,4	90%	Excelente	51,2
DG8	Adenocarcinoma	Difuso	80%	/-/	/-/	**	/-/	/-/
DG9	Mucosa normal	/-/	/-/	/-/	/-/	/-/	/-/	/-/
DG10	Adenocarcinoma	Difuso	90%	Ótima	28,3	90%	Excelente	35,6
DG11	Adenocarcinoma	Intestinal	90%	Excelente	56,2	100%	Boa	45,7
DG12	Adenocarcinoma	Intestinal	90%	Excelente	9,9	80%	Excelente	32,1
DG13	Mucosa normal	/-/	/-/	/-/	/-/	/-/	/-/	/-/
DG14	Adenocarcinoma	Pouco diferenciado	100%	Excelente	81,3	90%	Excelente	24,0
DG15	Adenocarcinoma	Intestinal	40%	/-/	/-/	/-/	/-/	/-/
DG16	Adenocarcinoma	Difuso	50%	/-/	/-/	/-/	/-/	/-/
DG17	Adenocarcinoma	Difuso	10%	/-/	/-/	/-/	/-/	/-/
DG18	Adenocarcinoma	Intestinal	90%	Excelente	59,5	100%	Ótima	63,8
DG19	Adenocarcinoma	Difuso	90%	Excelente	13,1	70%	Excelente	38,4
DG20	Adenocarcinoma	Difuso	90%	Excelente	61,2	90%	Excelente	30,7
DG21	Adenocarcinoma	Intestinal	90%	Excelente	22,8	80%	Excelente	21,6
DG22	Adenocarcinoma	Difuso	90%	Ótima	63,8	80%	Excelente	47,0
DG23	Adenocarcinoma	Difuso	100%	/-/	/-/	**	/-/	/-/
DG24	Adenocarcinoma	Intestinal	20%	/-/	/-/	/-/	/-/	/-/
DG25	Adenocarcinoma	Difuso	100%	Boa	46,1	100%	Excelente	24,7
DG26	Adenocarcinoma	Difuso	100%	Excelente	31,2	90%	Ótima	34,3

Cont/ Tabela 1

ID paciente	TECIDO TUMORAL				TECIDO NORMAL			
	Tipo histologic	Classificação Tumor	% Células	Qualidade DNA	Rend DNA	% células	Qualidade DNA	Rend. DNA
						50% (com muco)		
DG27	Adenocarcinoma	Difuso	100%	Excelente	30,4		Ótima	39,1
DG28	Adenocarcinoma	Intestinal	90%	Boa	33,1	90%	Excelente	32,7
DG29	Adenocarcinoma	Difuso	100%	Ótima	94,2	100%	Excelente	44,9
DG30	Adenocarcinoma	Intestinal	80%	Ótima	39,2	100%	Ótima	52,6
DG31	Adenocarcinoma	Mucinoso	80%	Boa	25,7	90%	Ótima	26,5
DG32	Adenocarcinoma	Intestinal	100%	Ótima	70,1	100%	Ótima	18,1
DG33	Adenocarcinoma	Difuso	90%	Ótima	15,4	90%	Excelente	14,4
DG34	Adenocarcinoma	Intestinal	70%	Excelente	20,2	100%	Excelente	24,1
DG35	Adenocarcinoma	Difuso	80%	Ótima	71,7	100%	Ótima	37,4
DG36	Adenocarcinoma	Intestinal	80%	Ótima	51,8	90%	Boa	21,8
DG37	Adenocarcinoma	Intestinal	80%	Boa	24,9	100%	Excelente	13,4
DG38	Adenocarcinoma	Difuso	90%	Ótima	6,9	90%	Excelente	28,1
DG39	Adenocarcinoma	Mucinoso	20%	/-/	/-/	/-/	/-/	/-/
DG40	Adenocarcinoma	Intestinal	90%	Boa	27,4	100%	Boa	26,6
DG41	Adenocarcinoma	Intestinal	90%	Ótima	42,6	100%	Excelente	18,8
DG42	Adenocarcinoma	Intestinal	80%	Excelente	32,2	100%	Boa	21,2
DG43	Adenocarcinoma	Difuso	100%	Ótima	17,3	100%	Boa	36,5
DG44	Adenocarcinoma	Intestinal	70%	Ótima	13,8	100%	Excelente	27,0
DG45	**	/-/	/-/	/-/	/-/	**	/-/	/-/
DG46	Adenocarcinoma	Intestinal	80%	Ótima	22,7	100%	Boa	13,5
DG47	Adenocarcinoma	Difuso	90%	Excelente	39,5	100%	Excelente	6,7
DG48	Adenocarcinoma	Difuso	100%	Excelente	4,7	100%	Ótima	57,7
DG49	Adenocarcinoma	Difuso	100%	Excelente	23,9	100%	Boa	10,0
DG50	Adenocarcinoma	Difuso	90%	Boa	29,3	100%	Excelente	23,4
DG51	Adenocarcinoma	Intestinal	90%	Excelente	12,9	100%	Excelente	17,7
DG52	Adenocarcinoma	Difuso	100%	Ótima	9,1	100%	Excelente	8,4

ID: identificação; RIN: da sigla *RNA integrity number*; ICC: Instituto do Câncer do Ceará; **material não enviado ao A.C.Camargo Cancer Center; Rend. DNA: rendimento do DNA em microgramas (ug).

✓ **Sequenciamento de Exoma**

Para avaliar mutações somáticas dos tumores gástricos, foi realizado o sequenciamento do exoma completo do tumor de 12 pacientes. Os casos foram cuidadosamente pareados nos critérios de tipo histológico, localização, sexo, idade, onde cada grupo compreende um caso de RPc ou Becker grau 1, e três de ausência de resposta ou Becker grau 3. Reforça-se que de todas as amostras coletadas, foram extraídos do DNA e guardados para futuras avaliações (Tabela 2).

A lista de amostras que entraram nesta análise seguiram os critérios sugeridos pelos Drs. Helano Freitas (A.C.Camargo Cancer Center) e Dra. Rosane Sant'ana (ICC). Primeiramente foi selecionada as amostras que apresentaram RPc ou Becker Grau 1 ao tratamento. Como obteve-se duas amostras com o tipo intestinal e 1 amostra com o tipo difuso, buscou-se três amostras não respondedoras que apresentassem as mesmas características histológicas da amostra respondedora, para realizarmos o pareamento da melhor forma possível. Para um dos casos respondedores (tipo histológico intestinal, localização proximal), não se conseguiu três amostras não respondedoras com a mesma classificação, dessa forma, buscamos um caso que melhor se aproximasse da amostra respondedora (tipo histológico intestinal e distal). Segue-se uma descrição breve das amostras (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Características das amostras selecionadas para o estudo, de acordo com a idade, sexo, tipo histológico e resposta tumoral alcançada.

Amostra	Idade	Sexo	Tipo Histológico	Resposta
DG25	66a	masculino	difuso, distal	Respondedor Não
DG1	59a	masculino	difuso, distal	Respondedor Não
DG20	57a	masculino	difuso, distal	Respondedor Não
DG48	67a	feminino	difuso, distal	Respondedor
DG37	44a	masculino	intestinal, distal	Respondedor Não
DG21	52a	masculino	intestinal, distal	Respondedor Não
DG32	63a	masculino	intestinal, distal	Respondedor Não
DG36	65a	masculino	intestinal, distal	Respondedor
DG51	63a	masculino	intestinal, proximal	Respondedor Não
DG18	62a	masculino	intestinal, proximal	Respondedor Não
DG42	65a	masculino	intestinal, proximal	Respondedor Não
DG40	40a	feminino	intestinal, distal	Respondedor

Tabela 3 - Pareamento das amostras selecionadas para o estudo, de acordo com o tipo histológico, localização do tumor, idade e sexo, além da resposta tumoral alcançada.

Respondedores –R- (grau 1)		Não respondedores – R- (grau 3)	
25	difuso, distal, 66a, masc.	1	difuso, distal, 59a, masc.
		20	difuso, distal, 57a, masc.
		48	difuso, distal, 67a, feminino
37	intestinal, distal, 44a, masc.	21	intestinal, distal, 52a, masc.
		32	intestinal, distal, 63a, masc.
		36	intestinal, distal, 65a, masc.
51	intestinal, proximal, 63a, masc.	18	Intestinal, proximal, 62a, masc
		42	intestinal, proximal, 65a, masc
		40	intestinal, distal, 40a, feminino

Masc: masculino

O DNA das amostras processados pelo Laboratório de Macromoléculas do A.C.Camargo Cancer Center foram utilizados para o preparo das bibliotecas.

O DNA de cada amostra tumoral foram utilizados individualmente para a realização das bibliotecas de DNA para sequenciamento do exoma. No caso das amostras dos leucócitos correspondentes a cada amostra tumoral, procedeu-se uma mistura do DNA (*pool* de DNA) com quantidade equivalentes aferidas em nanograma. As bibliotecas foram confeccionadas no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do A.C.Camargo Cancer Center, utilizando o kit *Ion TargetSeq Exome Enrichment for the Ion Proton System* (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. As sondas utilizadas incluem exons, sítios doadores e aceptores de *splicing*, incluindo >99,4% dos CCDs (*consensus coding DNA*) e > 97% das variantes do COSMIC V56 (<100 pares de base [bp]), compreendendo uma região de 37 Mb. Além disso, o kit também captura a região 3' UTR dos genes, que inclui 44. 100 sítios preditos de ligação a miRNA e 1. 472 RNAs não-codificadores como: miRNA, tRNA, snoRNA, lncRNA.

Resumidamente 1ug de DNA de cada amostra é fragmentado através de reação enzimática pela Ion Shear™ Enzyme Mix II (Thermo Fisher Scientific) por 30 minutos a 37°C seguido pela purificação do DNA fragmentado utilizando as *beads* magnéticas Agencourt AMPure XP Reagent (Beckman Coulter). O perfil da digestão foi verificado utilizando uma eletroforese capilar, com o equipamento BioAnalyzer (Agilent Technologies). Para as amostras tumorais, o preparo ocorreu de forma individual.

Na etapa seguinte foi realizado o reparo das extremidades dos fragmentos de DNA e a ligação dos adaptadores A e P1 (cada um deve se ligar a cada uma das extremidades do fragmento), e *barcodes* (sequência única que permite a identificação posterior de cada amostra, e está inserida no adaptador P1) para cada uma das amostras. Em seguida os fragmentos foram purificados utilizando as *beads* magnéticas Agencourt AMPure XP Reagent (Beckman Coulter). No passo seguinte, foi realizada a seleção dos fragmentos de interesse por tamanho, através do E-Gel Size-Select Agarose Gel 2% (Invitrogen). Por esse procedimento de eletroforese é possível coletar os fragmentos desejados (250-350 pb) seguindo um marcador como referência que indica o momento em que se deve fazer a captura do DNA de interesse no próprio gel. Após a captura é realizada uma nova purificação da amostra utilizando *beads* magnéticas Agencourt AMPure XP Reagent (Beckman Coulter) para retirada de possíveis contaminantes.

Uma vez que os fragmentos de tamanho ideal foram purificados, o passo seguinte foi a amplificação dos mesmos. Para isso, foi feita uma reação em cadeia polimerase (PCR) com *primers* que são complementares aos adaptadores A e P1 previamente inseridos. Portanto, apenas fragmentos que possuem os dois adaptadores diferentes ligados a eles serão amplificados. Para essa reação usamos a enzima Platinum PCR SuperMix High Fidelity (Thermo Fisher Scientific) e o conjunto de *primers* Library Amplification Primer Mix (Thermo Fisher Scientific).

Após a amplificação, foi feita nova etapa de purificação utilizando *beads* magnéticas Agencourt AMPure XP Reagent (Beckman Coulter).

Posteriormente as bibliotecas foram quantificados utilizando o Qubit dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific), uma vez que a próxima etapa inclui a hibridização de 500ng de biblioteca com as sondas de captura das regiões do exoma.

Nesta etapa, as bibliotecas foram hibridizadas individualmente com as sondas biotilinas complementares a todas as regiões exônicas. A reação de hibridização é feita a 47°C por 72 horas. Bloqueadores dos adaptadores A e P1 são colocados junto na reação, com o objetivo de evitar que sondas se liguem inespecificamente aos fragmentos devido à sequência dos adaptadores. Após o período de hibridização os fragmentos foram capturados através de *beads* magnéticas Dynabeads M-270 Streptavidin (Thermo Fisher Scientific), seguido de lavagens para descarte de impurezas da reação anterior. Novamente, foi realizada a amplificação dos fragmentos, purificação e verificação do perfil das bibliotecas através do BioAnalyzer (Agilent Technologies). Uma vez que essa etapa foi concluída, iniciou-se o processo de PCR em emulsão (ePCR).

Para uma quantificação precisa das bibliotecas, efetuou-se uma quantificação por qPCR, onde sondas se ligam especificamente às sequências P1 e A. O kit utilizado foi o Ion Library Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific).

Para a ePCR, utilizou-se o Ion PI Template OT2 200 Kit v3 (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as especificações do fabricante. A quantidade de molde (biblioteca final) necessária para essa reação foi de 100 pM em 100 µL de volume final. Nessa etapa cada fragmento foi

amplificado individualmente dentro de micelas formadas por uma mistura entre água e óleo. Dentro de cada micela existiu uma *Ion sphere particle* (ISP – nano partícula com sequências em sua superfície complementares a sequência do adaptador P1), uma molécula da biblioteca e reagentes necessários para a amplificação. O passo seguinte foi o enriquecimento dessas ISPS através da Dynabeads MyOne Streptavidin C1 Beads (Invitrogen), onde apenas as ISPS com fragmentos amplificados foram recuperados. Ao término dessa etapa, as amostras ficaram prontas para o sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado na plataforma Ion Proton (Ion Torrent). Este equipamento gera aproximadamente 12 Gb de dados, e permite a avaliação completa de um exoma por corrida. O sequenciamento foi realizado com o kit Ion PI™ Sequencing 200 Kit v3 de acordo com as recomendações do fabricante com o Ion PI Chip V3.

Para a análise dos dados gerados, foi realizado o alinhamento das sequências contra do genoma humano (Hg19) utilizando o software TMAP (Torrent mapper 5.0.13). A chamada de variantes foi realizada no software TVC v5. 0.3.5 - Torrent Variant Caller, com o pipeline do iontorrent (<http://mendel.iontorrent.com/ion-docs/>).

✓ **Seleção de Variantes genéticas**

A seleção das variantes foi realizado pela equipe do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do A.C.Camargo Cancer Center. Para isso, os arquivos VCFs (do inglês, *variante caller file*) foram importados para o

software VarSeq (Golden Helix) para anotações adicionais e filtragem de variantes. As variantes identificadas foram filtradas seguindo os seguintes critérios de qualidade e frequência: *quality by depth* > 2; *strand bias* < 0,8; HRUN (número de bases iguais seguidas – região de homopolímero) < 3 ou ausente; ausente em regiões de repetição do genoma (base de dados SuperDup); base variante presente em menos de 1% ou ausente no leucócito; ausência da variante em bancos de dados populacionais (do inglês, *ExAC - Exome Aggregation Consortium*) ou *MAF* (do inglês, *minimum allele frequency*) $\leq 0,01$; base variante presente em pelo menos 10% das leituras; base variante presente em pelo menos 4 *reads*. Posteriormente, as variantes foram selecionadas de acordo com seu efeito na proteína, sendo consideradas apenas: variantes classificadas como perda de função (do inglês, *LOF – Loss of Function*) (variantes do tipo *Frameshift*, *Indel* ou *Nonsense*), ou variantes *Missense* (deleção ou inserção *in frame*, troca de aminoácido) preditas como possivelmente patogênicas em menos três dos seis programas de predição utilizados (*SIFT – Sorting Intolerant from Tolerant*, *PolyPhen – Polymorphism Phenotyping 2*, *MutationTaster*, *Mutation Assessor*, *FATHMM - Functional Analysis through Hidden Markov Models*, *FATHMM MKL* - para *SNPS* variantes codificantes e não codificantes). Ainda, com o objetivo de excluir possíveis erros de sequenciamento e mapeamento, foram excluídas as variantes presentes em mais de 3 pacientes avaliados, e genes alterados em mais de 4 pacientes, o que ainda nos permite identificar mutações recorrentes em 30% de tumores gástricos.

As variantes selecionadas foram anotadas quanto a sua ocorrência em genes de interesse. Como critério de priorização para esta etapa foi utilizada uma lista de 49 genes, gentilmente fornecida pelo Dr. Emmanuel Dias Neto, cujos genes foram selecionados para um trabalho do grupo (aluna Melissa Pool Pizzi), e descritos como frequentemente mutados em tumores gástricos.

A Figura 2 sistematiza as etapas do processo de sequenciamento do exoma completo.

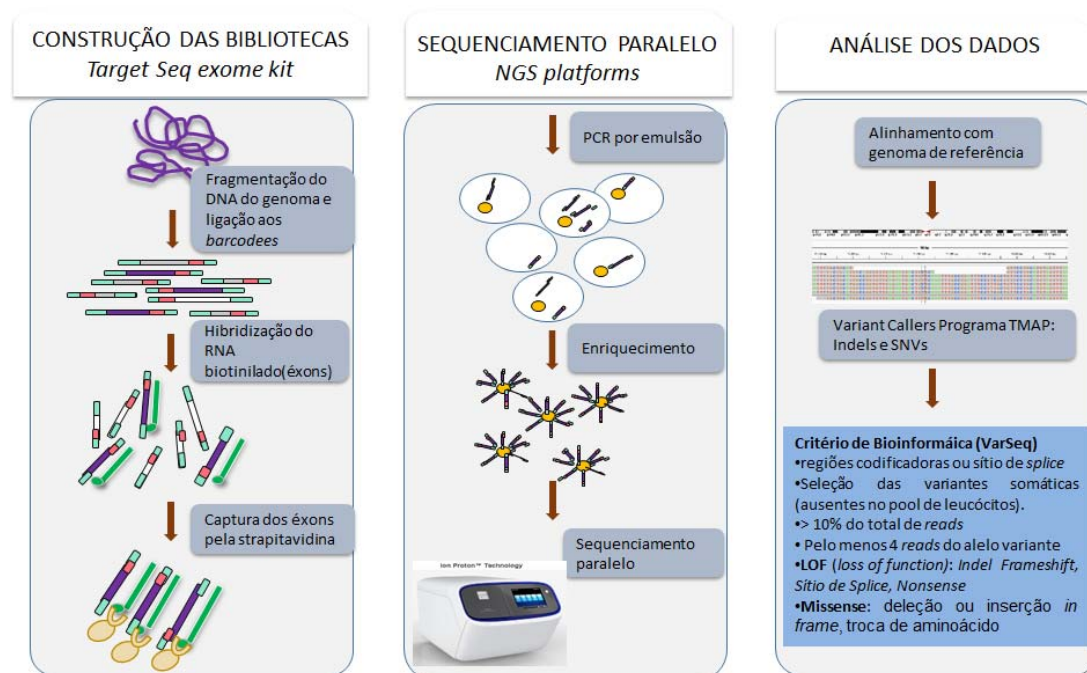


Figura 2 - Etapas do sequenciamento do exoma completo.

3.5 TOXICIDADES, SEGUIMENTO E ANÁLISES DE SOBREVIVÊNCIA

Todos os pacientes foram conduzidos na profilaxia e terapêutica dos efeitos adversos, de acordo com diretrizes clínicas internacionais para a prevenção e tratamento de mucosite induzida pela terapia do câncer. Os que apresentaram toxicidade gastrointestinal (diarréia) foram tratados segundo as diretrizes publicadas pela ASCO.

Realizou-se exames de hemograma completo, creatinina, enzimas hepáticas parenquimatosas, sódio e potássio até dois dias antes de cada aplicação de quimioterapia. As modificações de dose seguiram critérios estabelecidos pelos estudos clínicos que padronizaram o regime levando em consideração os Critérios de Toxicidade Comum (CTC) do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) versão 4.0 (Anexo 3). Foi administrada nova dose de quimioterapia para os pacientes com plaquetas acima de $100.000/\text{mm}^3$, hemoglobina acima de 10g/dl e neutrófilos segmentados acima de $1500/\text{mm}^3$.

✓ Toxicidade Clínica

Os pacientes estudados foram avaliados regularmente a cada ciclo quanto à toxicidade hematológica, gastrointestinal, neurológica, renal e aderência ao tratamento. Os pacientes foram pesados e foi feita anamnese e exame físico dirigidos para a pesquisa do estado nutricional e aferição rigorosa da toxicidade clínica. As reduções e atrasos de dose, relativos ao

plano terapêutico inicial foram considerados na análise da toxicidade clínica e foram realizados conforme diretrizes pré-estabelecidas.

✓ **Seguimento clínico**

Os pacientes foram reavaliados ambulatorialmente a cada 3 meses no primeiro e segundo ano pós-tratamento, e a cada 4 a 6 meses nos anos posteriores, considerando o início do estudo até dezembro de 2016, para fins de análises estatísticas. O seguimento foi realizado por meio de anamnese, exame físico completo e exames complementares (quando necessários) com vistas à detecção de recidiva ou óbito.

✓ **Sobrevida Livre de Doença**

Após a conclusão do tratamento proposto, os pacientes foram seguidos ambulatorialmente a intervalos regulares com vistas à detecção de recidiva tumoral, levando-se em conta o padrão dessa recidiva (local ou à distância), segunda malignidade ou morte de qualquer causa. Tal abordagem foi realizada conforme diretrizes do *NCCN* para seguimento de pacientes com diagnóstico de CG (anamnese, exame físico e exames complementares). A SLD foi determinada pelo tempo transcorrido desde a cirurgia até a primeira evidência de qualquer um dos eventos já descritos (em meses).

✓ **Sobrevida Global**

Os pacientes foram seguidos ambulatorialmente até o óbito. A SG foi mensurada pelo tempo transcorrido entre o diagnóstico de câncer até o óbito por qualquer causa e será medida em meses.

3.6 ÁREA DE INTERVENÇÃO GEOGRÁFICA E POPULAÇÃO ALVO

O estudo foi realizado com pacientes no Hospital Haroldo Juaçaba (HHJ), situado no bairro Rodolfo Teófilo na cidade de Fortaleza-Ceará. Foi também acessado 1 paciente proveniente do Hospital Geral de Fortaleza, localizado à Rua Ávila Goulart, 900, Papicu, Fortaleza-Ceará.

Os pacientes incluídos no projeto foram atendidos em ambulatório exclusivo para a realização da pesquisa, com preenchimento das fichas clínicas de atendimento e supervisionados pela unidade de pesquisa clínica.

3.7 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Levando-se em conta as taxas de regressão tumoral, os dados de literatura são pouco esclarecedores. A resposta tumoral à terapêutica neoadjuvante foi avaliada com estudos histopatológicos da peça cirúrgica, definindo-se em grau 1, 2 e 3, conforme já descrito previamente. Os

critérios de resposta patológica não são uniformes e optou-se por tentar detectar na população de estudo uma taxa de RPc à QTneo de 10%, sendo a RPc o desfecho primário do estudo. Desta forma, admitindo-se uma amplitude do intervalo de confiança para taxa de resposta de 10% (erro médio: $\pm 10\%$), um erro do tipo I de 0,05 e objetivando um poder de 80%, estimava-se que inicialmente seria necessária a inclusão de 43 pacientes, após uma análise em duas fases. Na primeira deveria-se ter 3 respostas em 18 pacientes e na segunda fase com 8 pacientes apresentando RPc. Porém, em razão de não ter sido atingido RPc na primeira fase, o recrutamento dos pacientes seguiu até o total de 63 pacientes.

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel e exportados para o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 17.0 para Windows no qual as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95%.

Para os dados quantitativos (média $\pm$ DP) foi traçado um ponto de corte por meio da construção de curvas ROC (sensibilidade e especificidade) tendo como desfecho a presença ou ausência de recidiva da lesão para categorização em lesões apresentando baixa e alta imunoexpressão de cada um dos marcadores avaliados.

Após isso, os dados categóricos foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e por meio dos testes Exato de Fisher/Qui-quadrado de Pearson realizou-se a comparação dos números de pacientes com e sem recidiva e as variáveis de análise desse estudo. Para os marcadores com associação significativa com as taxas de óbito ou de

recidiva ou de regressão tumoral, foram construídas curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para Sobrevida Global e para Sobrevida Livre de Doença, respectivamente, comparadas por meio do teste de Log Rank Mantel Cox.

Foram considerados estatisticamente significativos os dados que apresentarem $p < 0,05$.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi submetido a apreciação pelos Comitês de Ética em pesquisa (CEP) do HHJ e do HGF em 06/03/2013, sob o título “Avaliação do perfil de expressão gênica e da regressão tumoral em pacientes com cânceres gástricos localmente avançados submetidos à quimioterapia perioperatória” (Versão: 1CAAE: 17648513.3.0000.5528). Foi aprovado pelo CEP em 27/06/2013 – número do processo **316717**. Dada a necessidade de modificação na abordagem utilizada, o título do projeto foi modificado para “Avaliação do perfil mutacional, expressão protéica e regressão tumoral e das características clínicas de pacientes com cânceres gástricos localmente avançados submetidos à quimioterapia perioperatória” com a devida aprovação do CEP do A.C.Camargo Cancer Center. Os procedimentos utilizados neste estudo foram considerados de rotina na área médica, não havendo qualquer procedimento previsto que esteja fora das práticas habituais ao tratamento dos pacientes. Este estudo segue os padrões de aconselhamento de pesquisas em seres humanos, seguindo as recomendações da Declaração de Helsinque (Anexo 1), não tendo

dificuldades para a aprovação do comitê de ética local. Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participação deste estudo (Anexo 4).

4 RESULTADOS

Os resultados dessa casuísta mostram uma idade mediana dos pacientes de 62 anos (variando de 29 a 75 anos), com média de 57,6 + 10,6 anos. Houve um predomínio do sexo masculino (60,3%) versus feminino (39,7%). Quanto ao *performance status*, 53,8% foram classificados com ECOG 1, sendo perda de peso, vômitos e dor os principais sintomas iniciais. A perda de peso foi de 5,1+ 5,4 quilogramas, com mediana de 7,44 kg. A presença de vômitos ocorreu em 48,1% dos pacientes e dor em qualquer grau em 76,9% dos pacientes. O índice de massa corpórea (IMC) médio dos pacientes foi de 25,3 + 4,3, com hemoglobina de 11,2g/dl + 3 e albumina de 4,2g/dl + 0,4. Quanto à localização, 79% eram distais. Na classificação anatomopatológica, 44,4% eram do subtipo difuso, 33,3% intestinal 15,9% adenocarcinoma sem especificação, 6,3% misto (sem predomínio de um subtipo sobre outro) e 1 paciente classificado como misto de predomínio difuso. No grau de diferenciação, 71,4% eram pouco diferenciados. Destaca-se que pacientes do tipo difuso tinha idade média de 55,82 anos (variando de 29 a 75 anos, com mediana de 57 anos) e do tipo intestinal apresentavam média de 62 anos (40 a 74 anos, com mediana de 65 anos). A demonstração desses dados e de valores antropométricos e laboratoriais estão relacionados nas Tabelas 4 a 7. Dos sintomas iniciais, apenas a disfagia determinou pior

SLD (Figura 3) e pacientes com tumores pouco diferenciados obtiveram pior SG (Figura 4).

Tabela 4 - Perfil clínico e histopatológico de pacientes com câncer gástrico localmente avançado (CGLA).

	N	%
Idade		
Até 65 anos	43	68,3
Mais de 65 anos	20	31,7
Sexo		
Masculino	38	60,3
Feminino	25	39,7
Localização primário		
Proximal	13	20,6
Distal	50	79,4
Subtipos histológicos		
Difuso	28	44,4
Intestinal	21	33,3
Misto	4	6,3
Adenocarcinoma SOE	10	15,9
Grau de diferenciação		
Bem diferenciado	2	3,2
Moderadamente diferenciado	14	22,2
Pouco diferenciado	45	71,4
Indiferenciado	2	3,2

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Tabela 5 - Perfil sintomatológico de pacientes com CGLA.

	n	%
Peso perdido		
Até 8kg	33	60,0
Mais de 8kg	22	40,0
Houve perda de+10% 6 meses		
Não	22	34,9
Sim	41	65,1
Sangramento digestivo		
Não	44	69,8
Sim	19	30,2
Disfagia		
Não	45	71,4
Sim	18	28,6
Dor		
Ausência de dor	13	20,6
Presença de dor	50	79,4
Graus de dor		
Ausente	31	49,2
Graus 1 e 2	29	46,0
Graus 3 e 4	3	4,8
Presença de procedimentos para dieta		
Nao	62	98,4
Sim	1	1,6

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Tabela 6 - Perfil nutricional inicial e *performance status* por ECOG de pacientes com CGLA.

	n	%
Peso inicial		
Até 70kg	47	75,8
Mais de 70kg	15	24,2
Altura		
Até 1,55m	26	41,9
Mais de 1,55m	36	58,1
IMC		
Até 25	40	64,5
Mais de 25	22	35,5
ECOG inicial		
0	18	28,6
1	36	57,1
2	9	14,3

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Tabela 7 - Perfil laboratorial inicial de pacientes com CGLA.

	n	%
Hb pré-QT		
Até 11	26	42,6
Mais de 11	35	57,4
Albumina pré-QT		
Até 4,1	18	48,6
Mais de 4,1	19	51,4
CEA pré-QT		
Até 4	25	69,4
Mais de 4	11	30,6

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

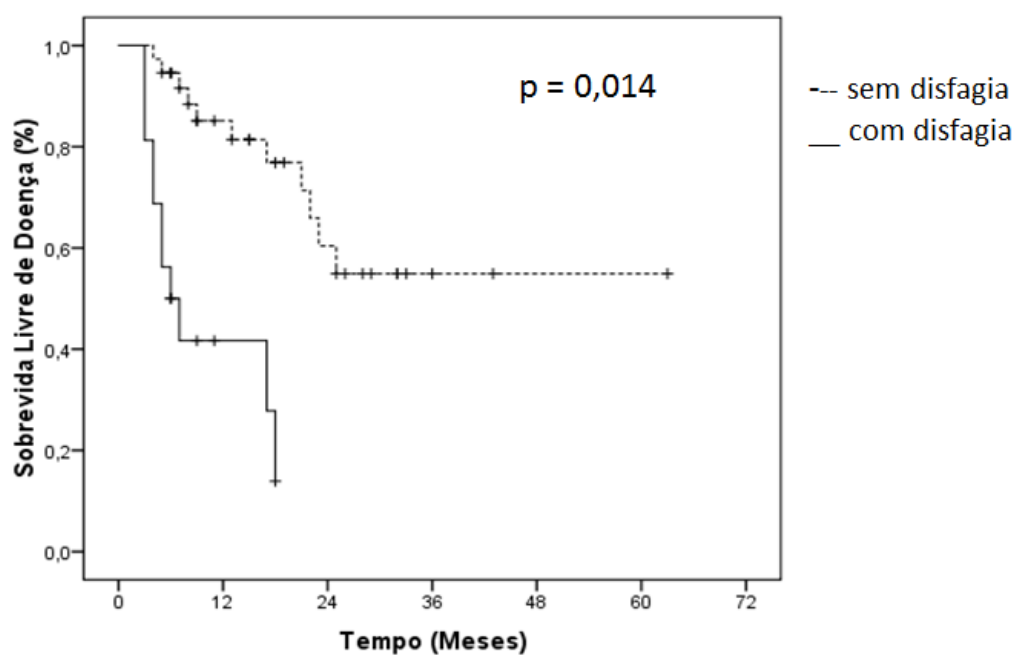
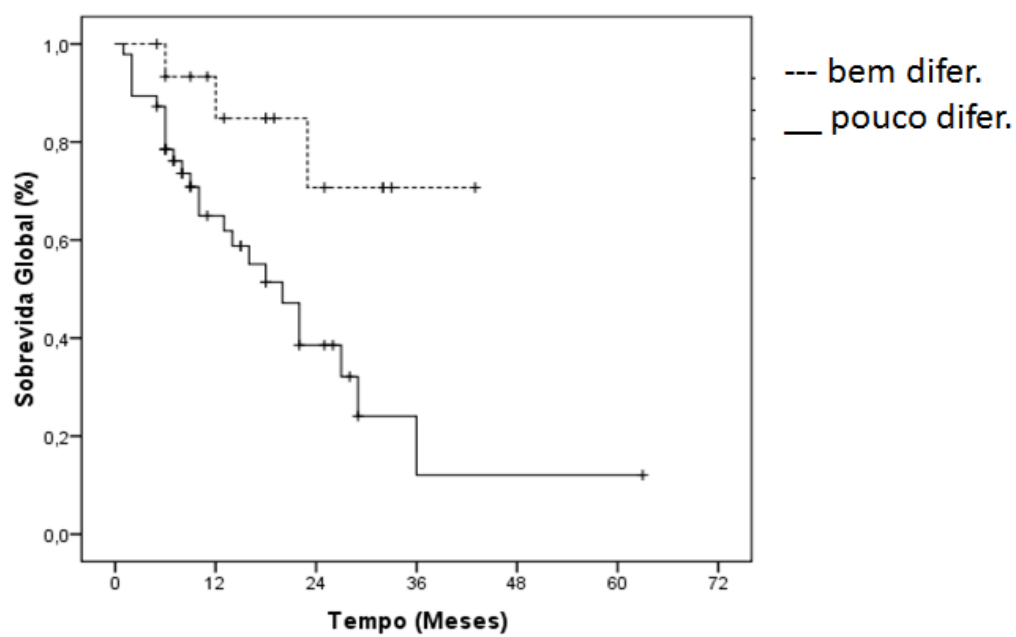


Figura 3 - Influência do sintoma disfagia na Sobrevida Livre de Doença.



* $p < 0,05$, Teste exato de Fisher ou Qui-quadrado.

Figura 4 - Influência do grau diferenciação tumoral na Sobrevida Global.

A maioria dos pacientes (74,6%) foi tratada com dose plena de quimioterapia, sem necessidade de redução de dose. Além disso, 85,7% dos pacientes completaram os 3 ciclos de quimioterapia pré-operatória (Tabela 8). Ocorreram 6 óbitos na primeira fase, relacionados ou não à quimioterapia, sendo as causas: 1 por neutropenia febril, 1 por insuficiência renal aguda, 2 por infecções respiratórias, 1 por leucemia aguda e 1 por acidente vascular isquêmico extenso com transformação hemorrágica. Esses pacientes não puderam ser avaliados quanto à resposta patológica e só foram incluídos nas avaliações de sobrevida.

Houve uma boa tolerância ao tratamento quimioterápico. As principais toxicidades foram: anemia (34,9% grau 1), neutropenia (15,9% grau 1 e 6,3% grau 2), síndrome mão-pé (SMP - 3 pacientes grau 1, 3 pacientes grau 2 e 2 pacientes grau 3). Náuseas e vômitos ocorreram em 58,6% dos pacientes nos graus 1 e 2. Mucosite oral (MO) grau 1 foi relatada em 35,5% dos pacientes. Esses dados são mostrados na Tabela 8. A Figura 5 mostra imagem de paciente com severa toxicidade pela capecitabina (SMP grau 3, com eritema, edema e bolhas). Das toxicidades à QT, observou-se que os pacientes que não desenvolveram MO alcançaram melhores sobrevidas e a ausência de anemia relacionou-se a melhores TRT (Tabela 9).

Tabela 8 - Perfil quimioterápico e de toxicidades de pacientes com CGLA.

	n	%
Houve redução de dose		
Não	47	74,6
Sim	16	25,4
Razão do fim da qt		
Completo tto	54	85,7
Toxicidade	3	4,8
Óbito	6	9,5
Graus de anemia durante toda a qt		
Grau 0	40	63,5
Grau 1	22	34,9
Grau 2	1	1,6
Grau máximo de neutropenia durante toda a qt		
Grau 0	47	74,6
Grau 1 e 2	14	22,2
Grau 3	2	3,2
Grau máximo de plaquetopenia durante a qt		
Grau 0	62	98,4
Grau 1	1	1,6
Náuseas e vômitos grau máximo durante toda qt		
Ausente	14	24,1
Graus 1 e 2	34	58,6
Graus 3 e 4	10	17,2
Grau máximo de MO durante toda a qt		
Grau 0	38	61,3
Grau 1	22	35,5
Grau 2	2	3,2
Sd. Mão-pé, graus durante a qt		
Grau 0	55	87,3
Grau 1 e 2	6	9,6
Grau 3	3	4,8

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.



Figura 5 - Fotografia dos pés da paciente 36 com síndrome mão-pé grau 3 após 6º ciclo de quimioterapia (com a permissão do paciente).

Tabela 9 - Influência do perfil de toxicidade à QT na SG e TRT.

	SOBREVIDA GLOBAL			TRT		
GRAUS ¹	Vivo	Óbito	p-Valor	Grau 1 e 2	Grau 3	p-Valor
ANEMIA						
Grau 0	20	20	0,205	11*	18	0,017
	(57,1%)	(71,4%)		(91,7%)	(51,4%)	
Grau 1	15	7		1	17*	
	(42,9%)	(25,0%)		(8,3%)	(48,6%)	
Grau 3	0	1		0	0	
	(,0%)	(3,6%)		(,0%)	(,0%)	
MUCOSITE ORAL						
Grau 0	16	22*	0,011	7	19	0,830
	(45,7%)	(81,5%)		(58,3%)	(54,3%)	
Grau 1	18*	4		5	15	
	(51,4%)	(14,8%)		(41,7%)	(42,9%)	
Grau 2	1	1		0	1	
	(2,9%)	(3,7%)		(,0%)	(2,9%)	

*p<0,05, Teste exato de Fisher ou Qui-quadrado.

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Três pacientes suspenderam a QT pré-cirurgia por oclusão arterial periférica aguda em membro inferior. A Figura 6 mostra a fotografia do pé com isquemia em 5º pododáctilo esquerdo, com hiperemia e necrose

ungueal do paciente 52 (isquemia vascular periférica grau 1, Anexo 3). Ocorreu diarreia em 13 pacientes graus 1 e 2. Nenhum paciente relatou toxicidade auditiva e 2 pacientes apresentaram disfunção renal, como apresentado na Tabela 10.



Figura 6 - Fotografia do pé esquerdo do paciente 52, apresentando aspecto isquêmico (hiperemia com necrose ungueal) em 5° pododáctilo (com a permissão do paciente).

Tabela 10 - Perfil de toxicidades à QT de pacientes com CGLA.

	n	%
Disfunção renal durante toda a qt		
Grau 0	61	96,8
Grau 1	2	3,2
Ototoxicidade durante toda a qt		
Grau 0	63	100,0
Diarreia durante toda a qt		
Ausente	48	77,4
Graus 1 e 2	13	21,0
Graus 3 e 4	1	1,6
Constipação durante toda a qt		
Grau 1	40	63,5
Grau 1	20	31,7
Grau 2	3	4,8

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Quanto à cirurgia, 73% dos pacientes foram operados, com 34 gastrectomias totais, 7 subtotaais e 16 cirurgias paliativas (derivação gástrica e/ou múltiplas biópsias). O tempo mediano entre a última dose de quimioterapia e a cirurgia foi de 66 dias e o tempo de internação foi de 11,32 dias de média e com 65,1% dos pacientes operados no intervalo de 60 a 120 dias (variando de 15 a 130 dias). Linfadenectomia a D2 foi feita em 97,4% dos casos e esplenectomia ocorreu em 4 pacientes. A média de linfonodos ressecados foi de 26,05 (com mediana de 24 e variação de 10 a 53 linfonodos). Houve 5,7% de deiscência de ferida operatória e 4 óbitos, 2 por infecção respiratória e 2 por sepse de origem indeterminada (tabelas 11 e 12). Pacientes operados com intervalo entre 30 a 60 dias obtiveram melhor SLD (Figura 7). A cirurgia impactou positivamente na SG e a gastrectomia total determinou melhor SLD (Figuras 8 e 9). Ausência de esplenectomia denotou melhor SG (Tabela 13).

Tabela 11 - Perfil cirúrgico de pacientes com CGLA.

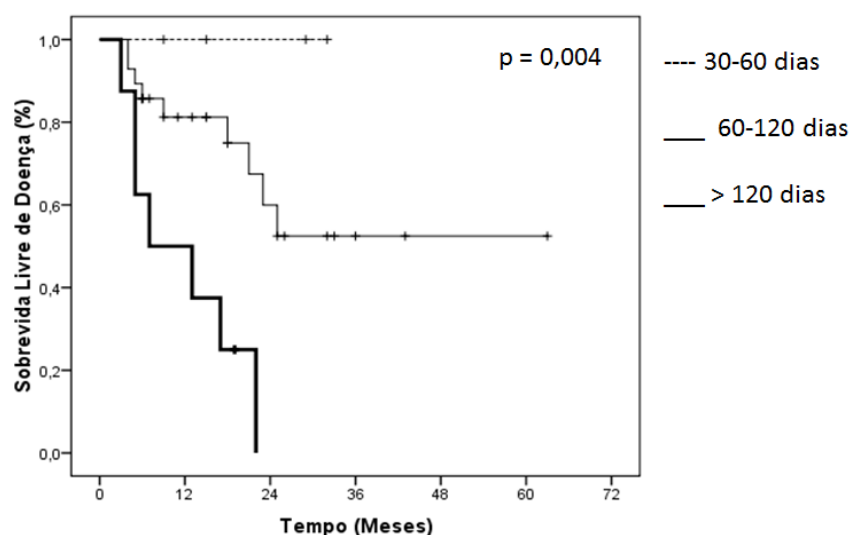
	n	%
Houve cirurgia		
Não	17	27,0
Sim	46	73,0
Tipo de cirurgia		
Gastrectomia total	34	54,0
Gastrectomia subtotal	7	11,1
Paliativa	13	20,6
Tipo de linfadenectomia		
D1	1	2,6
D2	38	97,4
Houve esplenectomia		
Não	44	91,7
Sim	4	8,3

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Tabela 12 - Perfil temporal cirúrgico e de complicações pós-operatórias de pacientes com CGLA.

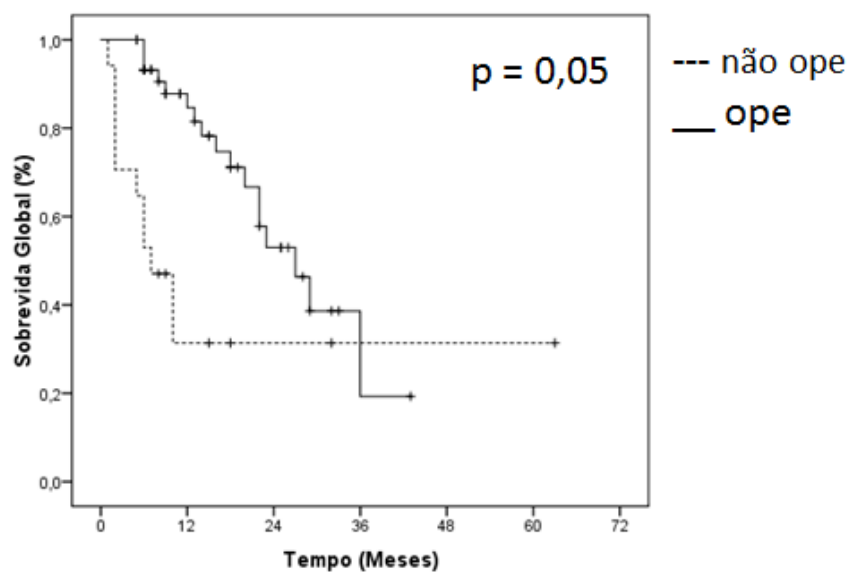
	n	%
Tempo cirurgia qt		
Até 95	42	84,0
Mais de 95	8	16,0
Intervalo entre última qt e cirurgia (dias)		
Menor 30	1	2,3
30 – 60	6	14,0
60-120	28	65,1
Maior 120	8	18,6
Tempo internação		
Menor que 11	32	57,1
Maior ou igual a 11	24	42,9
Deiscência de ferida		
Não	50	94,3
Sim	3	5,7
Outras infecções não de parede abdominal		
Não	48	92,3
Respiratória	4	7,7
Fístula		
Não	51	96,2
Sim	2	3,8
Presença e tipo de choque		
Não	48	90,6
Septico	5	9,4

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.



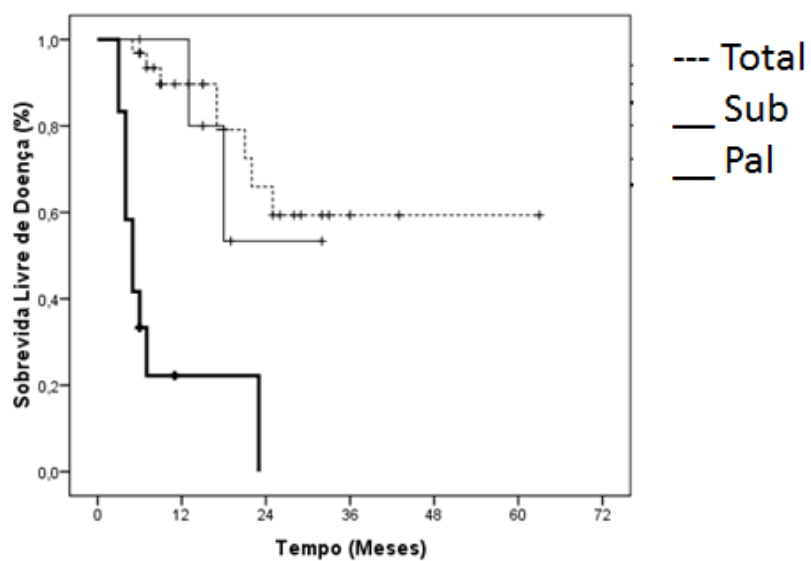
*p<0,05, Teste exato de Fisher ou Qui-quadrado.

Figura 7 - Influência do intervalo QT-cirurgia na sobrevida.



* $p < 0,05$, Teste exato de Fisher ou Qui-quadrado.

Figura 8 - Influência da presença de cirurgia (não operados & operados) na sobrevida



* $p < 0,05$, Teste exato de Fisher ou Qui-quadrado.

Figura 9 - Influência do tipo de cirurgia (total & subtotal & paliativa) na sobrevida.

Tabela 13 - Influência da esplenectomia na sobrevida.

	SOBREVIDA GLOBAL			STATUS DE RECIDIVA		
Não	33*	11	0,007	27	13	0,596
	(100%)	(73,3%)		(93,1%)	(86,7%)	
Sim	0	4*		2	2	
	(,0%)	(26,7%)		(6,9%)	(13,3%)	

*p<0,05, Teste exato de Fisher ou Qui-quadrado.

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Regressão tumoral graus 1 e 2 foi alcançada em 12 pacientes, contra 35 sem resposta tumoral e 16 pacientes não avaliáveis, com uma TRT de 19,1%. Quanto ao estadiamento patológico, verificou-se predomínio de tumores avançados (T0/T1 – 9,7%, T2 – 22% e T3 53,7% e T4 14,6%). A média de linfonodos ressecados foi de 25,41 com mediana de 23. Os pacientes apresentaram menos comprometimento linfonodal (N0 43,9%, N1 17,1%, N2 12,2% e N3 26,8%). A presença de invasão vascular-linfática foi observada em 62,8% e a perineural em 44,2%. As margens cirúrgicas foram negativas em 92,7% dos casos. A Tabela 14 sinaliza os dados anatomopatológicos. As respostas de regressão tumoral grau 1 2 e 3 são exemplificadas nas fotografias que se seguem 10, 11 e 12, respectivamente, em ampliação de 10x em campo de grande aumento (CGA). Pacientes sem invasão linfonodal apresentaram melhores sobrevidas e menos recidiva (Tabela 15). Melhores regressões tumorais relacionaram-se a ausência de invasão vascular-linfática e a presença de margens livres denotou melhor SLD (Tabela 16 e Figura 13).

Tabela 14 - Estadiamento patológico e gradação de regressão tumoral de pacientes com CGLA no período de agosto de 2013 a dezembro de 2016.

	N	%
TNM referente à Tumor		
T0	3	7,3
T1	1	2,4
T2	9	22,0
T3	22	53,7
T4	6	14,6
TNM referente aos linfonodos		
N0	18	43,9
N1	7	17,1
N2	5	12,2
N3	11	26,8
Presença de invasão angiolinfática		
Não	16	37,2
Sim	27	62,8
Presença de invasão perineural		
Não	24	55,8
Sim	19	44,2
Presença de margens comprometidas		
Não	38	92,7
Sim	3	7,3
Taxa de regressão patológica		
Grau 1	5	10,6
Grau 2	7	14,9
Grau 3	35	74,5

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

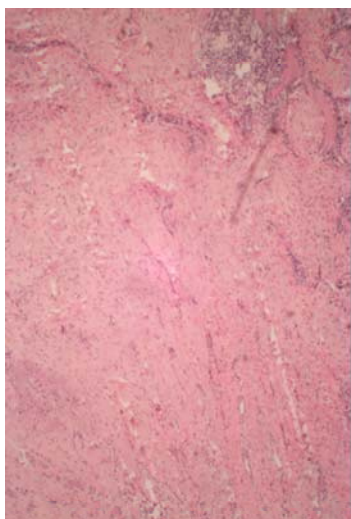


Figura 10 - Apresentação em aumento de 10x de fotografia de resposta grau 1 (resposta patológica completa, paciente 25). (Laboratório de Patologia Hospital Haroldo Juaçaba - HHJ – Fortaleza-Ce 2016)

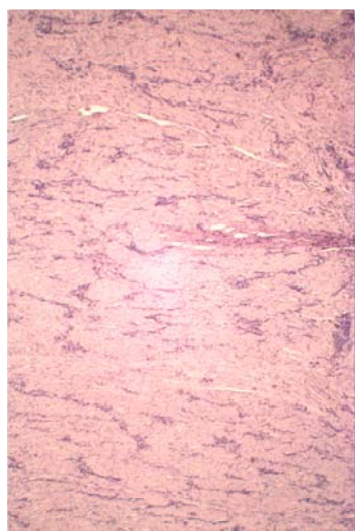


Figura 11 - Apresentação em aumento de 10x de resposta grau 2 (resposta parcial, paciente 9) (Laboratório de Patologia HHJ – Fortaleza - CE 2016).

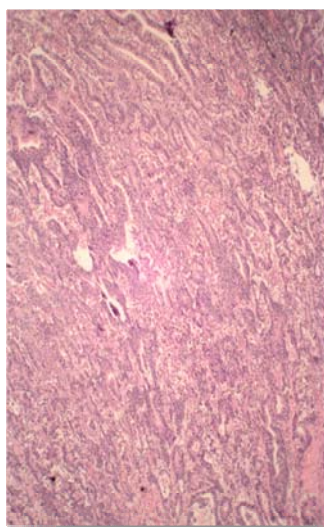


Figura 12 - Apresentação em aumento de 10x de resposta grau 3 (ausência de resposta, paciente 19), (Laboratório de Patologia HHJ – Fortaleza - CE 2016)

Tabela 15 - Influência do estadiamento linfonodal na sobrevida e recidiva.

	SOBREVIDA GLOBAL			STATUS DE RECIDIVA		
	Vivo	Óbito	p-Valor	Ausente	Presente	p-Valor
ESTÁDIO N						
N0	16*	2	0,017	17*	1	0,001
	(55,2%)	(16,7%)		(60,7%)	(10,0%)	
N1	6*	1		6*	0	
	(20,7%)	(8,3%)		(21,4%)	(,0%)	
N2	3	2		2	3*	
	(10,3%)	(16,7%)		(7,1%)	(30,0%)	
N3	4	7*		3	6*	
	(13,8%)	(58,3%)		(10,7%)	(60,0%)	

*p<0,05, Teste exato de Fisher ou Qui-quadrado.

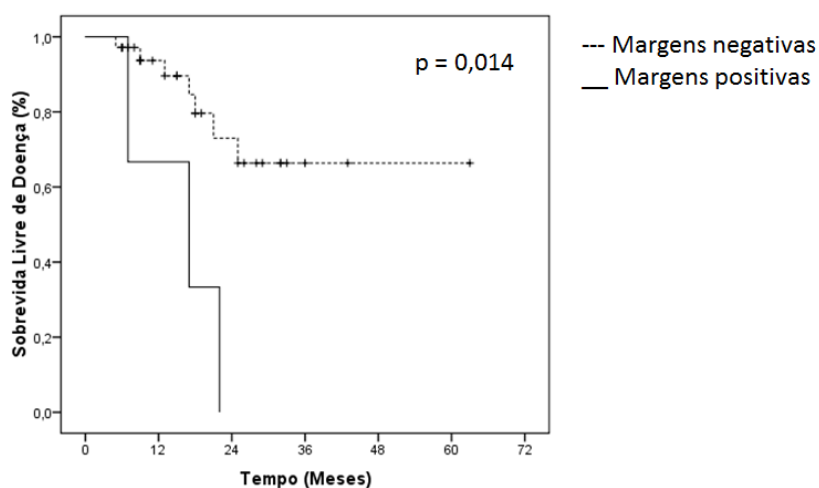
Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 16 - Influência da presença de invasão vascular-linfática nas taxas de regressão tumoral.

INVASÃO VASCULAR-LINFÁTICA	TAXAS DE REGRESSÃO TUMORAL		
	Grau 1 e 2	Grau 3	p-Valor
Nao	8*	8	0,032
	(66,7%)	(26,7%)	
Sim	4	22*	
	(33,3%)	(73,3%)	

* $p < 0,05$, Teste exato de Fisher ou Qui-quadrado.

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.



* $p < 0,05$, Teste exato de Fisher ou Qui-quadrado.

Figura 13 - Influência do comprometimento das margens cirúrgicas na SLD.

Após a cirurgia, 46,8% dos pacientes concluíram os 3 ciclos pós-operatórios. Os motivos relatados para a suspensão da quimioterapia foram principalmente por PD (29%), toxicidade (9,7%) e óbito 14,5%). Os pacientes que progrediram foram tratados com radioterapia e/ou QT paliativa. Ocorreram 28 óbitos ao longo do estudo, com 49,2% dos pacientes livres de recidiva até o final do estudo (dados descritos na Tabela 17)

Tabela 17 - Perfil de tratamento e de sobrevida e recidiva dos pacientes com CGLA no período de agosto de 2013 a dezembro de 2016.

	n	%
Razão de suspensão de qt no pos		
Completo esquema	29	46,8
Toxicidade	6	9,7
Progressão	18	29,0
Óbito	9	14,5
Sobrevida Global		
Vivo	35	55,6
Óbito	28	44,4
Status de recidiva		
Sem doença	31	49,2
Com doença	22	34,9
Óbito	10	15,9

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

✓ **Análise da imunoistoquímica**

Foi realizado a pesquisa por IHQ dos marcadores HER-2, FOXP3, CD8 intratumoral (CD8i), CD8 peritumoral (CD8p), CD 68i, CD68p, c-MET e HER-2 em amostras tumorais pós-QT, tanto de gastrectomias quanto de biópsias em caso de cirurgia paliativa. Observou-se 51,5% de expressão positiva de FOXP3 nas amostras tumorais. Apenas 3 pacientes foram HER-2 positivo por IHQ (3+), dentre 55 pacientes avaliados. Quanto ao status c-MET 20 pacientes de 44 pesquisados, apresentavam expressão positiva. As percentagens de CD8 e CD68 peri e intratumoral estão apontadas na Tabela 18. As Figuras 14 (**A** e **B**) mostram imagens de pacientes com c-MET positivo e negativo (paciente com subtipo intestinal) e 15 mostra marcação de FOXP3 (**A** a **D**) e a Figura 16 mostra marcação em aumento de 40x de CD8 (**A** – intratumoral, **B** – peritumoral) e CD68 (**C** – intratumoral e **D** - peritumoral).

Tabela 18 - Perfil imunoistoquímico de pacientes com CGLA no período de agosto de 2013 a dezembro de 2016.

	N	%
FOXP3		
Não	17	51,5
Sim	16	48,5
CD8 i		
Baixo	36	66,7
Alto	18	33,3
CD8 p		
Baixo	21	55,3
Alto	17	44,7
CD68 i		
Baixo	44	81,5
Alto	10	18,5
CD68 p		
Baixo	13	34,2
Alto	25	65,8
c-MET		
Negativo	24	38,1
Positivo	20	31,7
Não avaliável	19	30,2
HER-2 em 2 categorias		
Negativo	52	94,5
Positivo	3	5,5

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

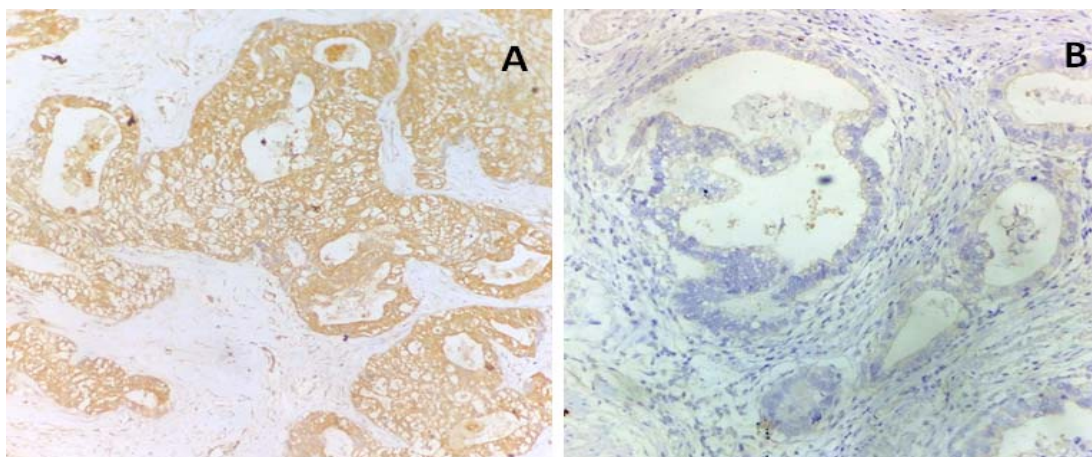


Figura 14 - Apresentação em aumento de 10x de resultado imunoistoquímico de paciente com câncer gástrico subtipo intestinal com expressão presente e ausente de c-MET. **A**- Marcação positiva por IHQ de c-met do paciente 5, subtipo intestinal, **B** - Marcação negativa por IHQ de c-met do paciente 3, subtipo intestinal, imagem cedida pelo Laboratório de Patologia do HHJ Fortaleza CE (10x CGA)

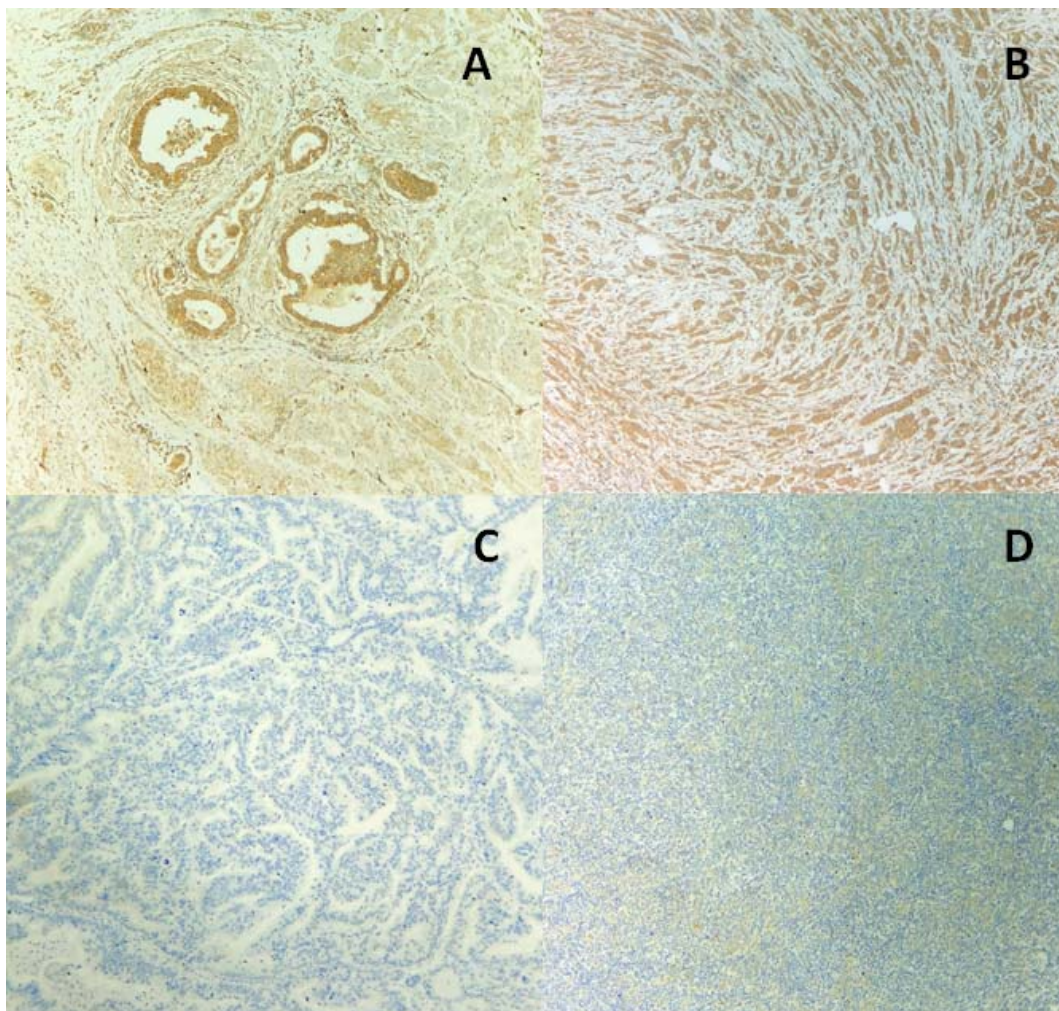


Figura 15 - Apresentação em aumento de 10x de resultado imunoistoquímico de pacientes com cânceres gástricos dos subtipo intestinal e difuso, com expressão positiva e negativa, respectivamente. **A** - Marcação positiva por IHQ de FOXP3 em paciente com subtipo intestinal, do paciente 51, **B** - Marcação positiva por IHQ de FOXP3 em paciente com subtipo difuso do paciente 11, **C** - Marcação negativa por IHQ de FOXP3 em paciente com subtipo intestinal 18, do paciente 54, **D** - Marcação negativa por IHQ de FOXP3 em paciente com subtipo difuso, do paciente 57, imagens cedidas pelo Laboratório de Patologia do HHJ (10x CGA).

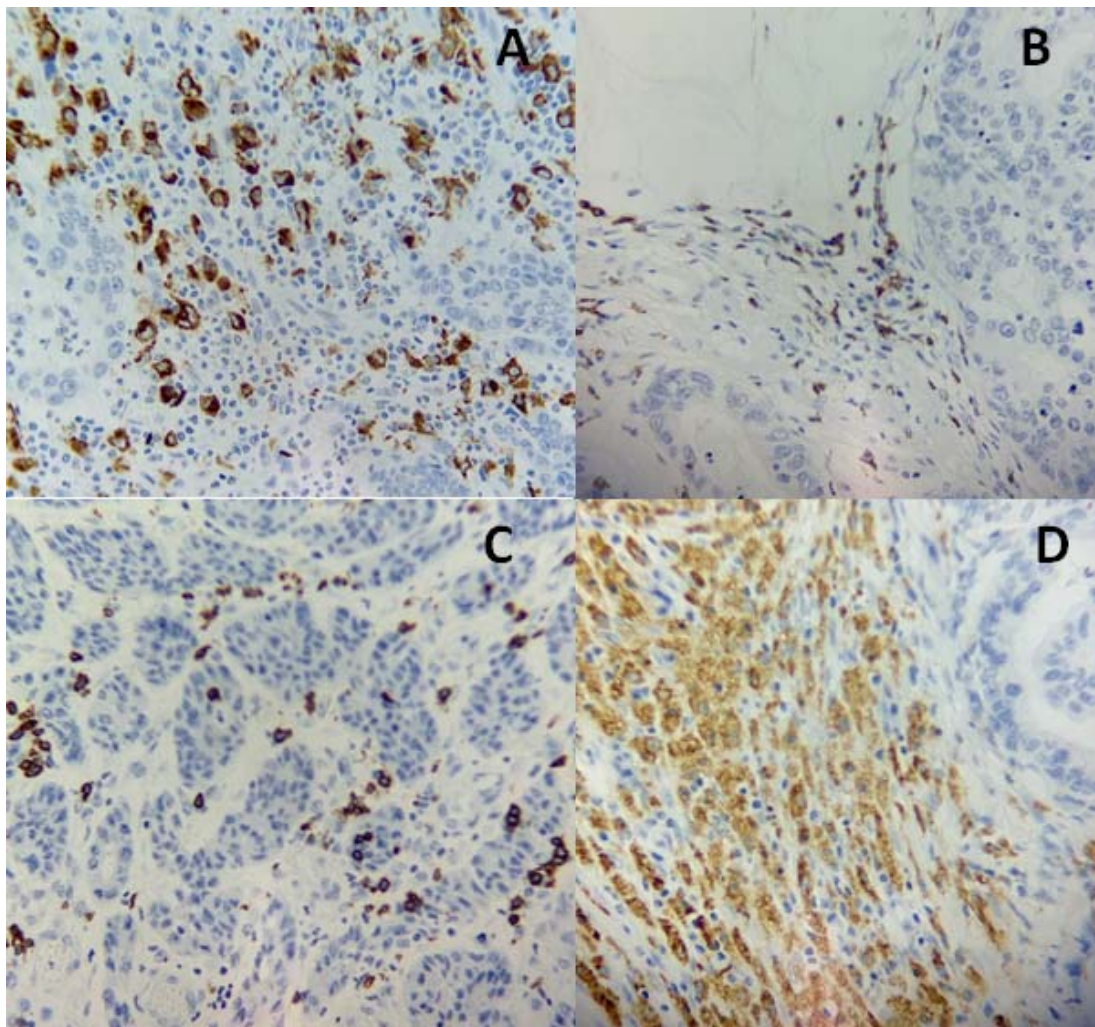
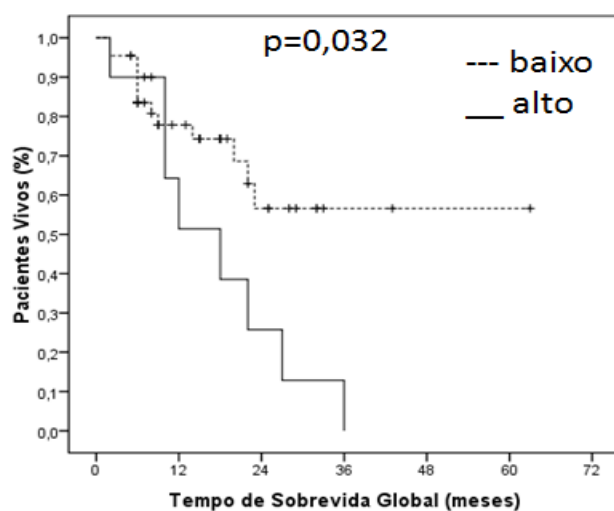


Figura 16 - Apresentação em aumento de 40x de resultado imunoistoquímico de paciente com câncer gástrico subtipo difuso com expressão alta e baixa dos marcadores CD8 e CD68, tanto intratumoral quanto peritumoral. **A** - Marcação por IHQ de CDi em paciente com subtipo difuso, do paciente 57, **B** - Marcação por IHQ de CD8p em paciente com subtipo difuso, do paciente 57, **C** - Marcação por IHQ de CD68i em paciente com subtipo difuso, do paciente 57, **D** - Marcação por IHQ de CD68p em paciente com subtipo difuso, do paciente 57, imagens cedidas pelo Laboratório de Patologia do HHJ.

O marcador de macrófago CD68 determinou alterações nos desfechos. A baixa expressão de CD68i designou uma sobrevida de 41 ± 5 meses versus $18,4 \pm 4$ meses no grupo com alta expressão (Figura 17), bem como a SLD de 40 ± 5 meses versus 16 ± 4 meses, porém sem significância estatística para esse último dado (Figura 18). Outro dado relevante foi a correlação entre sobrevida e expressão de c-MET. A ausência de expressão protéica do c-MET foi associada a sobrevida de 34 ± 5 meses, valores bem distintos quando se apresenta expressão positiva. A Figura 19 aponta essa curva. Os demais marcadores imunoistoquímicos não influíram na sobrevida, recidiva e TRT.



* $p < 0,05$, Teste exato de Fisher ou Qui-quadrado.

Figura 17 - Curva de Sobrevida Global em associação à baixa e alta expressão de CD68.

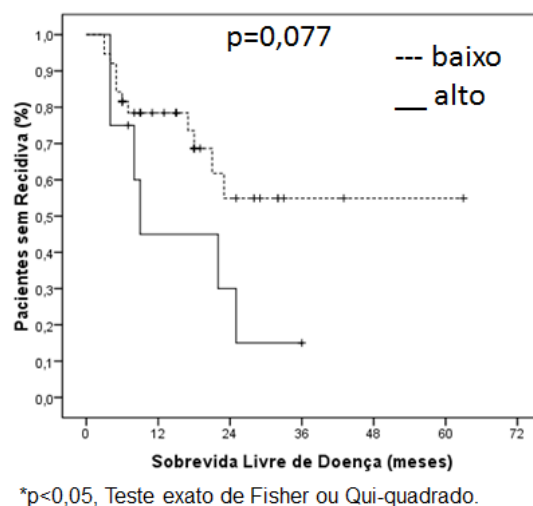


Figura 18 - Curva de Sobrevida Livre de Doença em associação à baixa e alta expressão de CD68.

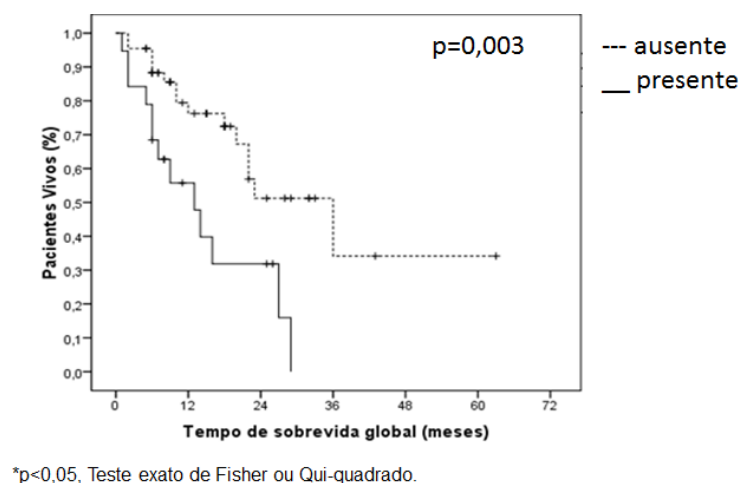


Figura 19 - Curva de Sobrevida Global em associação à expressão de c-MET.

Em nossa casuística, o tempo médio de sobrevida foi de 29,4 meses. A Figura 20 representa a curva de SG de Kaplan-Meier nesse estudo para os 63 pacientes avaliados. O tempo médio da SLD foi de 34 ± 4 meses (Figura 21). Não encontramos relação entre as taxas de regressão tumoral e sobrevidas, como apontada nas Figuras 22 e 23. Em análise multivariada,

observou-se que a Sobrevida Global foi 44,62 vezes maior nos paciente sem invasão linfonodal (N0) e 26,62 vezes maior nos casos com CD68 intratumoral baixo (Tabela 19).

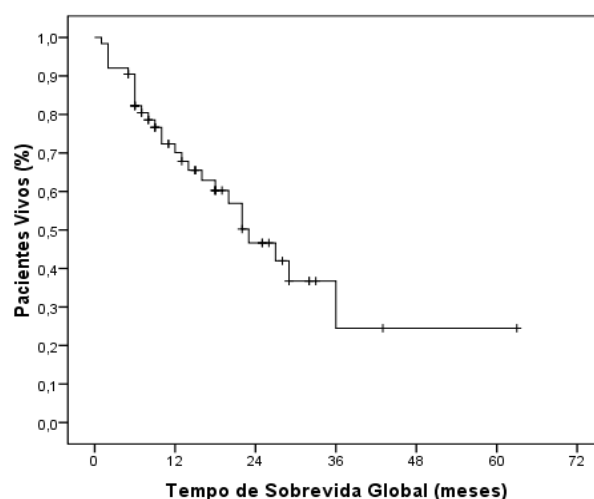


Figura 20 - Curva de Sobrevida Global de Kaplan-Meier de pacientes com CGLA diagnosticados e atendidos no HHJ no período de agosto de 2013 a dezembro de 2016. O tempo médio de sobrevida da presente amostra foi 29 ± 4 meses.

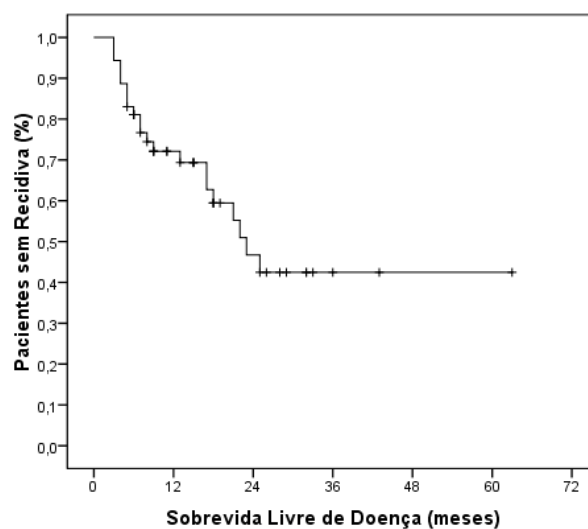


Figura 21 - Curva de Sobrevida Livre de Doença de Kaplan-Meier de pacientes com câncer gástrico diagnosticados e atendidos no HHJ no período de agosto de 2013 a dezembro de 2016. O tempo médio de Sobrevida Livre de Doença da presente amostra foi 34 ± 4 meses.

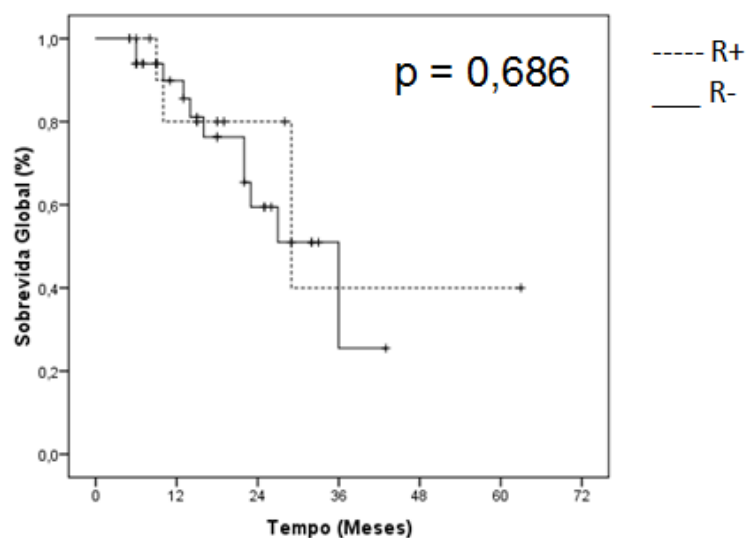


Figura 22 - Curva de Sobrevida Global em relação as taxas de regressão tumoral G1 e G2 versus G3 (respondedor e não respondedor).

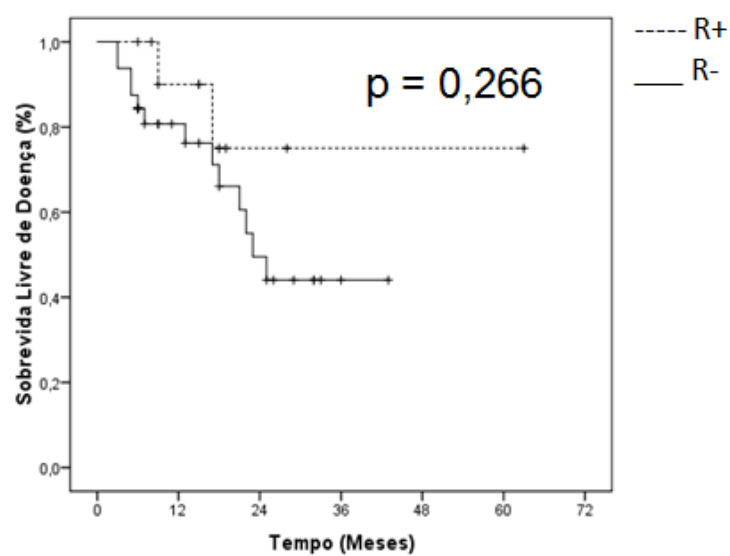


Figura 23 - Curva de Sobrevida Livre de Doença em relação as taxas de regressão tumoral G1 e G2 versus G3 (respondedor e não respondedor).

Tabela 19 - Análises multivariadas relacionando sobrevida, recidiva e regressão tumoral.

	p-Valor	OR Ajustada	IC 95%	
Sobrevida Global				
Grau de diferenciação	0,408	-	-	-
Cirurgia	0,346	-	-	-
Esplenectomia	1,000	-	-	-
TNM patológico (n0)	0,030	44,62	1,45	1376,63
TNM patológico (n1)	0,794	-	-	-
TNM patológico (n2)	0,997	-	-	-
CD68 intra baixo	0,042	26,62	1,12	633,06
CMET	0,165	-	-	-
Livre de recidiva				
Disfagia	0,680	-	-	-
Peso inicial	1,000	-	-	-
TNM patológico (t0)	0,998	-	-	-
TNM patológico (t1)	1,000	-	-	-
TNM patológico (t2)	0,996	-	-	-
TNM patológico (t3)	0,190	-	-	-
TNM patológico (n0)	0,192	-	-	-
TNM patológico (n1)	0,997	-	-	-
TNM patológico (n2)	0,405	-	-	-
Margens comprometidas	1,000	-	-	-
CD68 intra baixo	0,398	-	-	-
Resposta Grau I e II				
Graus de vômitos	0,127	-	-	-
Hemoglobina pré	0,164	-	-	-
TNM patológico (t0)	0,998	-	-	-
TNM patológico (t1)	1,000	-	-	-
TNM patológico (t2)	0,996	-	-	-
TNM patológico (t3)	0,190	-	-	-
TNM patológico (n0)	0,192	-	-	-
TNM patológico (n1)	0,997	-	-	-
TNM patológico (n2)	0,405	-	-	-
Invasão angiolinfática negativa	0,006	53,54	3,05	940,28
CD68 peri baixo	0,268	-	-	-

*p<0,05, regressão logística multinomial. As variáveis com associação significativa com os desfechos Sobrevida Global, recidiva e resposta foram submetidas a modelo de regressão logística multinomial.

✓ Mutações somáticas identificadas por Sequenciamento de Exoma Completo

O sequenciamento do exoma completo das 12 amostras tumorais e do pool de DNA gerou em média 12,3 Gb de dados por corrida, 81.669.527 *reads*, com 96,35% de *reads on target*, e um tamanho médio de fragmento sequenciado de 170 pb.

A cobertura média de leitura das amostras, assim como sua porcentagem de leituras nas regiões alvos (*reads on target*), foram descritas na Tabela 20. Nota-se que para a maioria das amostras, obteve-se uma cobertura média de 100 leituras, que é considerado uma cobertura adequada no sequenciamento de exoma completo. Somente para a amostra 36T, a cobertura média ficou 93,47, muito próxima ao ideal, e portanto, a amostra foi mantida para as análises posteriores.

Tabela 20 - Cobertura de leitura das bases de cada amostra sequenciada.

Amostra	Cob Média	% de bases 0	% de bases >1	% de bases >10	% de bases >20	% de bases >50	% de bases >100
DG25T	124,95	6,9	93,10	83. 3	78. 0	67. 3	51. 3
DG 1T	108,80	8,6	91,4	80. 3	74. 6	63. 3	46. 4
DG 20T	120,43	3,2	96,8	92. 0	88. 1	75. 9	52. 2
DG 48T	122,93	3,2	96,8	92. 8	89. 7	79. 2	55. 5
DG 37T	120,69	4,6	95,40	89. 0	84. 5	73. 2	53. 1
DG 21T	110,05	2,9	97,1	93. 2	89. 7	77. 0	49. 0
DG 32T	112,31	2. 1	97,9	94. 6	90. 5	74. 0	46. 0
DG 36T	93,47	2. 6	97,4	93. 0	87. 7	68. 1	36. 9
DG 51 T	127,05	3. 6	96,40	90. 9	86. 7	75. 4	54. 8
DG 18T	136,64	3. 1	96,9	92. 4	89. 0	78. 0	56. 0
DG 42T	125,14	2. 7	97,3	93. 7	90. 7	80. 2	55. 8
DG 40T	125,07	2. 1	97,9	95. 5	93. 4	83. 6	55. 8
Pool Normal	209,64	1. 8	98,2	96. 1	94. 5	88. 7	75. 7

Para selecionar apenas as mutações somáticas, utilizou-se o filtro mencionado na sessão de material e métodos, onde se exclui alterações que estivessem presentes em mais que 1% das leituras do *pool* de leucócitos.

As análises resultaram em uma média de 333 variantes por amostra, sendo em média 180 SNVs e 152 *indels*, como pode ser observado na Tabela 21. Neste momento, como a amostra 36T apresentou os dados de sequenciamento de baixa qualidade, promovendo a identificação de mais de 10 mil alterações somáticas, sugestivo de erros ou artefatos de sequenciamento, esta foi excluída das análises. Novo sequenciamento dessa amostra deve ser realizado para avaliarmos com cautela se esse número excessivo de mutações somáticas identificadas pode ser atribuído a alguma característica biológica particular dessa amostra, ou a baixa qualidade da biblioteca e com isso alcançar uma análise com resultados mais robustos.

Tabela 21 - Alterações somáticas encontradas nas amostras.

Amostra	Número de alterações totais	Número de Genes	SNV Total	SNVs		Indel Total	Indel	
				Missense	LOF		Inserção	Deleção
DG 25T	261	258	173	161	12	88	67	21
DG 01T	272	265	202	189	13	70	58	12
DG 20T	185	178	117	110	7	68	52	16
DG 48T	802	755	253	240	13	549	518	31
DG 37T	241	234	153	143	10	88	59	29
DG 21T	475	455	200	185	15	275	228	47
DG 32T	263	257	162	152	10	101	72	29
DG 51T	325	316	236	216	20	89	66	23
DG 18T	308	300	204	190	14	104	86	18
DG 42T	341	331	211	202	9	130	113	17
DG 40T	184	181	73	63	10	111	93	18
Média	333	321	180	168	12	152	128	24

SNV: do inglês *single nucleotide variant*, *indel*: inserção ou deleção de bases, *missense*: troca de base que leva a mudança de aminoácido, LOF: do inglês *loss of function* (leva a perda da função da proteína por uma provável inserção de um codon de parada prematuro).

Para selecionar-se os genes mais relevantes envolvidos com CG, comparou-se os genes identificados nesse trabalho, com uma lista de 49 genes frequentemente mutados em tumores gástricos, disponibilizada pelo grupo do Dr. Emmanuel Dias Neto. Essa comparação nos levou a identificação de 25 genes já descritos por outros grupos como mutados em CG. Interessantemente, todas as amostras apresentaram ao menos um gene alterado que estava presente na lista dos genes frequentemente mutados em CG, o que de certa forma, valida os resultados obtidos neste estudo. Os genes e as alterações estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 - Genes frequentemente mutados em tumores gástricos identificados em nosso estudo.

Amostra	Gene*	Alteração	Alteração cDNA	Alteração Proteína	Frequência (%)
DG1T	<i>KIF13A</i>	T/G	c. 3569A>C	p. Gln1190Pro	48
DG1T	<i>MUC6</i>	G/A	c. 5645C>T	p. Thr1882Met	23
DG18T	<i>HMCN1</i>	G/A	c. 12074G>A	p. Gly4025Asp	61
DG18T	<i>PTPRC</i>	T/C	c. 2954T>C	p. Val985Ala	10
DG18T	<i>TP53</i>	G/A	c. 574C>T	p. Gln192Ter	30
DG20T	<i>BRCA2</i>	G/A	c. 8918G>A	p. Arg2973His	47
DG20T	<i>FLG</i>	T/C	c. 149A>G	p. Asp50Gly	39
DG20T	<i>KMT2C</i>	G/A	c. 12817C>T	p. Pro4273Ser	36
DG21T	<i>FBXL7</i>	C/T	c. 1075C>T	p. His359Tyr	60
DG21T	<i>LAMA1</i>	-/C	c. 4729_4730iNGS	p. Ser1577fs	54
DG21T	<i>COL11A1</i>	C/A	c. 5234G>T	p. Arg1745Leu	18
DG25T	<i>ARID1A</i>	C/T	c. 3826C>T	p. Arg1276Ter	42
DG25T	<i>MACF1</i>	CT/-	c. 14392_14393delCT	p. Ser4799fs	27
DG32T	<i>ARHGAP21</i>	C/T	c. 3361G>A	p. Gly1121Ser	48
DG32T	<i>THSD7B</i>	-/G	c. 4414_4415iNGS	p. Lys1472fs	47
DG32T	<i>TP53</i>	G/A	c. 541C>T	p. Arg181Cys	20
DG37T	<i>ALPK2</i>	G/A	c. 6428C>T	p. Pro2143Leu	50
DG40T	<i>FAT4</i>	G/A	c. 8539G>A	p. Ala2847Thr	22
DG40T	<i>EP300</i>	C/T	c. 7015C>T	p. His2339Tyr	55
DG40T	<i>TP53</i>	T/C	c. 736A>G	p. Met246Val	58
DG42T	<i>PTPN23</i>	-/A	c. 890_891insA	p. Leu298fs	55
DG42T	<i>COL11A1</i>	-/C	c. 1910dupG	p. Pro638fs	52
DG42T	<i>FLG</i>	-/G	c. 11804dupC	p. Gln3936fs	72
DG42T	<i>PKHD1</i>	A/G	c. 9788T>C	p. Val3263Ala	51
DG42T	<i>ERBB2</i>	G/T	c. 3547G>T	p. Asp1183Tyr	25
DG42T	<i>MACF1</i>	G/A	c. 1814G>A	p. Arg605Gln	22
DG48T	<i>PIK3CA</i>	T/G	c. 1134T>G	p. Cys378Trp	18
DG48T	<i>RIMS2</i>	-/A	c. 1433_1434insA	p. Arg479fs	12
DG48T	<i>ZIC4</i>	G/C	c. 656C>G		46
DG48T	<i>FAT4</i>	C/-	c. 13520delC	p. Ile4508fs	13
DG48T	<i>EP300</i>	-/A	c. 2330_2331insA	p. Thr778fs	15
DG48T	<i>MACF1</i>	C/T	c. 23C>T	p. Thr8Met	49
DG51T	<i>SPTA1</i>	-/G	c. 6795dupC	p. Lys2266fs	4
DG51T	<i>PKHD1</i>	G/A	c. 7307C>T	p. Thr2436Ile	50
DG51T	<i>KMT2C</i>	C/T	c. 12434G>A	p. Arg4145His	44
DG51T	<i>ERBB2</i>	A/C	c. 236A>C	p. Glu79Ala	36
DG51T	<i>TP53</i>	C/T	c. 993+1G>A	r. spl?	45

ND: não descrita * COSMIC ID: *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*

O gene mais frequentemente mutado foi o *TP53* (NM_000546. 5) detectado em quatro amostras (32T 18T, 40T e 51T), sendo 3 do mesmo grupo (não respondedores), que apresentaram mutações consideradas patogênica pelos programas de predição e todas já descritas no banco de dados COSMIC (Tabela 23). Além disso, o gene *MACF1* foi detectado mutado em 3 amostras tumorais, sendo uma delas INDEL que gera um códon de parada prematuro e duas *missenses* que foram classificadas nos programas de predição como potencialmente patogênicas em 3 dos 6 programas utilizados.

Tabela 23 - Alterações encontradas no gene *TP53*.

Chr:Pos	Ref/Alt	Paciente	F. A (%) ¹	Tipo ²	C-DNA ³	Proteína ⁴	COSMIC ID
17:7578389	G/A	32T	20,2	<i>Missense</i>	c. 541C>T	p. Arg181Cys	ND
17:7576852	C/T	51T	45,4	<i>LoF</i>	c. 993+1G>A	r. spl?	ND
17:7577545	T/C	40T	58,8	<i>Missense</i>	c. 736A>G	p. Met246Val	ND
17:7578275	G/A	18T	30,5	<i>LoF</i>	c. 574C>T	p. Gln192Ter	ND

1. Frequência de alteração 2. Tipo de alteração 3. Alteração do c-DNA 4. Alteração da proteína ND: não descrita Chr: Pos: posição cromossômica da alteração; Ref/Alt: Base referencia/Base alterada;

✓ **Busca de genes mutados com potencial associação à resposta a tratamento**

Com o objetivo de identificar potenciais biomarcadores associados com resposta à quimioterapia perioperatória em CGLA, buscou-se variantes ou genes mutados que apareceram preferencialmente ou exclusivamente em um dos grupos analisados (respondedores e não respondedores). Para

isso, selecionou-se variantes comuns entre pelo menos duas das três amostras respondedoras, ou emno mínimo três das oito não respondedoras. O mesmo processo foi realizado com genes mutados independente da mutação detectada.

Para o grupo de respondedores foram encontradas 9 alterações comuns entre 2 das 3 amostras, sendo que nenhuma alteração foi encontrada nas 3 amostras (Tabela 24). Nesse grupo de amostras, no entanto, não encontramos nenhum gene mutado em comum.

Tabela 24 - Alterações comuns entre o grupo de amostras respondedoras.

Gene ¹	Ref/Alt	Pct ²	F. A. ³	Tipo ⁴	C-DNA ⁵	Proteína ⁶
<i>PCDHGA5</i>	A/G	25T	46	<i>missense</i>	c. 1199A>G	p. Asn400Ser
<i>PCDHGA5</i>	A/G	37T	50	<i>missense</i>	c. 1199A>G	p. Asn400Ser
<i>TLL1</i>	-/C	25T	53	<i>frameshift</i>	c. 65_66insC	p. Gly23fs
<i>TLL1</i>	-/C	51T	64	<i>frameshift</i>	c. 65_66insC	p. Gly23fs
<i>PCNXL4</i>	-/G	25T	4,5	<i>frameshift</i>	c. 959_960iNGS	p. Lys321fs
<i>PCNXL4</i>	-/G	51T	65	<i>frameshift</i>	c. 959_960iNGS	p. Lys321fs
<i>OR1E2</i>	TTGCAGATAC/	25T	32	<i>frameshift</i>	c.725_734delGTATC TGCAA	p. Ile243fs
<i>OR1E2</i>	TTGCAGATAC/	51T	76	<i>frameshift</i>	c.725_734delGTATC TGCAA	p. Ile243fs
<i>SLC1A5</i>	C/G	25T	13	<i>missense</i>	c. 1549G>C	p. Gly517Arg
<i>SLC1A5</i>	C/G	51T	4	<i>missense</i>	c. 1549G>C	p. Gly517Arg
<i>POFUT2</i>	-/A	25T	98	<i>frameshift</i>	c. 354_355insT	p. Val119fs
<i>POFUT2</i>	-/A	51T	4	<i>frameshift</i>	c. 354_355insT	p. Val119fs
<i>TNFRSF1B</i>	T/C	37T	46	<i>missense</i>	c. 791T>C	p. Leu264Pro
<i>TNFRSF1B</i>	T/C	51T	50	<i>missense</i>	c. 791T>C	p. Leu264Pro
<i>NELL1</i>	-/A	37T	98	<i>frameshift</i>	c. 244_245insA	p. Arg82fs
<i>NELL1</i>	-/A	51T	9,5	<i>frameshift</i>	c. 244_245insA	p. Arg82fs
<i>ABCA7</i>	G/A	37T	72,5	<i>missense</i>	c. 5435G>A	p. Arg1812His
<i>ABCA7</i>	G/A	51T	30	<i>missense</i>	c. 5435G>A	p. Arg1812His

1. mutações não descritas no COSMIC em CG 2. Paciente 3. Frequência de alteração 4. Tipo de alteração 5. Alteração no C-DNA 6. Alteração na proteína

Em relação ao grupo não respondedor composto de 8 amostras, não se detectou nenhuma variante presente em pelo menos três das nove amostras. No entanto, detectou-se 9 genes mutados presentes em 3 das 8 amostras. Os genes estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 - Genes em comum entre o grupo de amostras não respondedoras.

Gene	Ref/Alt	Paciente	F. A. ¹	Tipo ²	cDNA ³	Proteína ⁴	COSMIC
<i>IGFN1</i>	-/G	18T	36	<i>frameshift</i>	c. 4815_4816iNGS	p. Leu1606fs	ND ⁵
<i>IGFN1</i>	-/G	20T	12	<i>frameshift</i>	c. 4815_4816iNGS	p. Leu1606fs	ND
<i>IGFN1</i>	-/G	21T	23	<i>frameshift</i>	c. 4815_4816iNGS	p. Leu1606fs	ND
<i>FAM8A1</i>	C/T	18T	6	<i>frameshift</i>	c. 731C>T	p. Pro244Leu	4160385
<i>FAM8A1</i>	C/T	32T	8	<i>frameshift</i>	c. 731C>T	p. Pro244Leu	4160385
<i>FAM8A1</i>	C/T	42T	12	<i>frameshift</i>	c. 731C>T	p. Pro244Leu	4160385
<i>KHNYN</i>	-/T	18T	5,8	<i>frameshift</i>	c. 806_807insT	p. Trp270fs	ND
<i>KHNYN</i>	-/T	32T	9	<i>frameshift</i>	c. 806_807insT	p. Trp270fs	ND
<i>KHNYN</i>	-/T	42T	12,5	<i>frameshift</i>	c. 806_807insT	p. Trp270fs	ND
<i>SIPA1L1</i>	-/C	18T	5,8	<i>frameshift</i>	c. 877_878insC	p. Ser294fs	ND
<i>SIPA1L1</i>	-/C	32T	22	<i>frameshift</i>	c. 877_878insC	p. Ser294fs	ND
<i>SIPA1L1</i>	-/C	48T	4,8	<i>frameshift</i>	c. 877_878insC	p. Ser294fs	ND
<i>POU2F1</i>	G/C	20T	14	<i>missense</i>	c. 478G>C	p. Val160Leu	ND
<i>POU2F1</i>	G/C	32T	8	<i>missense</i>	c. 478G>C	p. Val160Leu	ND
<i>POU2F1</i>	G/C	48T	4	<i>missense</i>	c. 478G>C	p. Val160Leu	ND
<i>B9D1</i>	-/A	21T	7,6	<i>frameshift</i>	c. 559_560insT	p. His187fs	ND
<i>B9D1</i>	-/A	32T	6,5	<i>frameshift</i>	c. 559_560insT	p. His187fs	ND
<i>B9D1</i>	-/A	42T	15	<i>frameshift</i>	c. 559_560insT	p. His187fs	ND
<i>RAD51B</i>	-/C	21T	16	<i>frameshift</i>	c. 786_787insC	p. Leu263fs	ND
<i>RAD51B</i>	-/C	40T	6	<i>frameshift</i>	c. 786_787insC	p. Leu263fs	ND
<i>RAD51B</i>	-/C	42T	8	<i>frameshift</i>	c. 786_787insC	p. Leu263fs	ND
<i>TRIOBP</i>	-/C	32T	10,8	<i>frameshift</i>	c. 2193_2194insC	p. Ala732fs	ND
<i>TRIOBP</i>	-/C	40T	21	<i>frameshift</i>	c. 2193_2194insC	p. Ala732fs	ND
<i>TRIOBP</i>	-/C	48T	21	<i>frameshift</i>	c. 2193_2194insC	p. Ala732fs	ND
<i>DHODH</i>	-/C	32T	6,2	<i>frameshift</i>	c. 18_19insC	p. Lys7fs	ND
<i>DHODH</i>	-/C	42T	98	<i>frameshift</i>	c. 18_19insC	p. Lys7fs	ND
<i>DHODH</i>	-/C	48T	5	<i>frameshift</i>	c. 18_19insC	p. Lys7fs	ND

1. Frequência de alteração em % 2. Tipo de alteração 3. Alteração no C-DNA 6. Alteração na proteína 5. ND: Não descrita

Se estes genes ou variantes estão associados com resposta ao tratamento em CG, novas análises em uma maior casuística serão necessárias. Abaixo segue o diagrama de Venn, representando todos os genes mutados em nossas amostras, entre pacientes R+ e R- e no perfil comum (Figura 24).

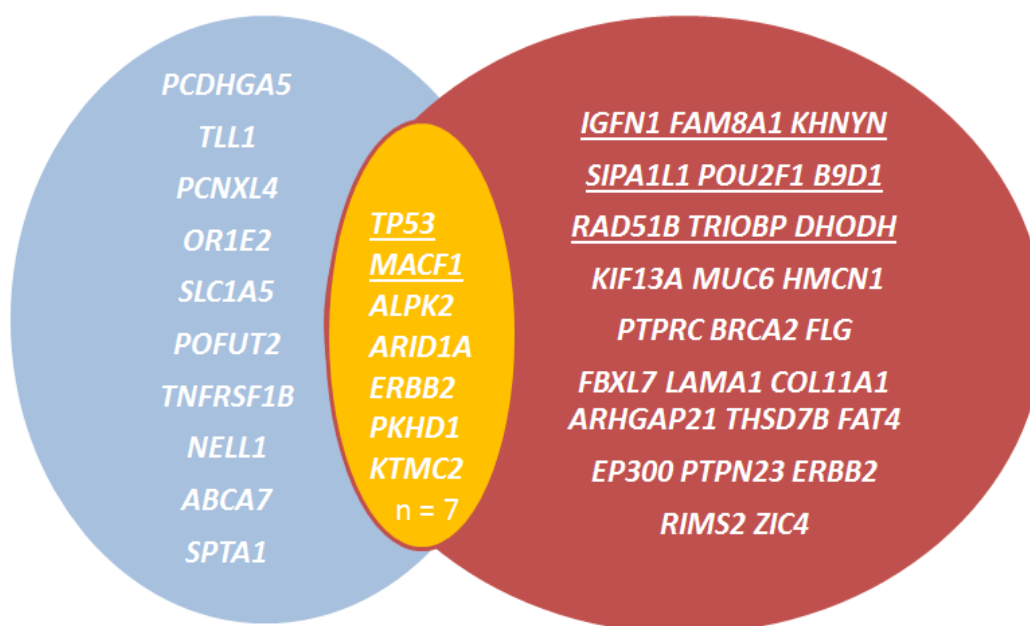


Figura 24 - Diagrama de Venn mostrando os grupos de genes mutados de pacientes R+ (azul) e R- (vermelho) e os genes em comum.

Um resumo das mutações encontradas e suas correlações com as funções biológicas, além da localização no cromossomo e da descrição da prevalência em CG é relatado na Tabela 26. A Tabela 27 aponta os genes que ainda não tinham sido relacionados no CG previamente, com suas localizações e funções conhecidas. A Figura 25 resume os principais genes mutados com suas funções biológicas relacionadas ao perfil de resposta tumoral encontrada em cada grupo. As Tabelas 28 e 29 relaciona as

mutações encontradas no grupos de pacientes com subtipo difuso versus intestinal.

Tabela 26 - Principais genes mutados nos pacientes com CGLA dessa casuística, com seus grupos funcionais, localização cromossômica, frequência de mutação e subtipo histológico e/ou molecular relatado.

Grupo funcional	Gene	Cromossomo	Frequência ¹	Classificação ²
Integridade genômica	<i>TP53</i>	17p13	36,4 – 55%	Intestinal
	<i>RAD51</i>	14q24. 1	*	Intestinal
	<i>BRCA2</i>	13q13. 1	0 a 13,6%	Não relatado
Citoesqueleto e motilidade celular	<i>MACF1</i>	1p34. 3	*	Não relatado
	<i>SPTA1</i>	1q23	*	**
	<i>TLL1</i>	4q32. 2	*	**
	<i>TRIOBP</i>	22q13. 1	*	CG familiar
	<i>KIF13A</i>	6p22. 3	*	**
Remodelamento da cromatina	<i>ARID1A</i>	1p36. 11	16,7- 31. 1%	MSI, EBV positive
	<i>KMT2C</i>	7q36. 1	**	**
	<i>ARHOAP21</i>	10p12. 1 10p12. 3	**	**
	<i>EP300</i>	22q13. 1	*	CG com MSI
Via RTC	<i>ERBB2</i>	17q12	3,3 – 9,1%	Intestinal
	<i>SLC1A5</i>	19q13. 32		
	<i>NELL1</i>	11p15. 1	-----	Marcador de CG
	<i>PIK3CA</i>	3q26. 32	2 a 21,7%	TCGA*****
	<i>PTPRC</i>	1q31. 1-32. 1		
	<i>PTPN23</i>	3p21. 31		
Adesão celular	<i>PCDHA5</i>	5q31. 1		**
	<i>FAT4</i>	4q28. 1	3,3 – 24,2%	Intestinal, H pilori+
	<i>HMCN1</i>	1q25. 3-31. 1		
	<i>FLG</i>	1q21. 3		
	<i>LAMA1</i>	18p11. 31		CG com MSI
Via Wnt	<i>SIPA1L1</i>	14q24. 1		
	<i>POU2F1</i>	1q24. 1		Difuso
Proteção de mucosa	<i>MUC6</i>	11p15. 1	9,6% MSS e 18,2% MSI	Instabilidade de microsatélite

1 e 2. Frequência da mutação em CG e classificação molecular extraídos do TCGA descrito no site www.cbioportal.org (GAO et al. 2013)*desconhecido **Não descrito em CG*** MSS (estabilidade de microsatélite) e MSI (com instabilidade de microsatélite)

Tabela 27 - Genes “novos” ainda não relatados em CG previamente, descritos nessa casuística, mostrando a localização, funções biológicas conhecidas e associação com as patologias conhecidas.

Gene	Localização	Funções biológicas	Dados clínicos
<i>ALPK2</i>	18q12. 3-q22. 2	- apoptose, - RAS, + genes de reparo	desconhecido (LHF do 18q – <i>DCC</i> e <i>SMAD4</i>)
<i>PKHD1</i>	6p12. 3-12. 2	Fibrocistina	Doença renal policística
<i>PCDHA5</i>	5q31. 2	Adesão celular	Desconhecido
<i>TLL1</i>	4q32. 2	MEC ¹ , TGF beta	Hepatocarcinoma
<i>SLC1A5</i>	19q13. 32	Via mTOR	Desconhecido
<i>MACF1</i>	1p34. 3	Via mTOR	Desconhecido
<i>PCNXL4</i>	13		Desconhecido
<i>ORIE2</i>	17p13. 2	Proteína G/receptores olfatórios	Desconhecido
<i>KMT2C</i>	7q36. 1	mTORC/glutaminólise	esôfago, próstata, pulmão, leukemia
<i>POFUT2</i>	21	Trombospodina, FCE ²	Gliomas
<i>TNFRS1b</i>	1p36. 22	TNF ³ , IAP ⁴	Ca Esôfago, ca colon
<i>ABCA7</i>	19p13. 3	Equilíbrio lipídico/sistema immune	D. de Alzheimer, ca de pâncreas
<i>SPTA1</i>	1q23	Espectrina/citoesqueleto	Hemoglobinopatias, ca colon
<i>IGFN1</i>	1q32. 1	Síntese protéica	Ca Mama
<i>FAM8A1</i>	6p22. 3	Progressão tumoral	Ca Urotelial
<i>KHNYN</i>	14q12	Ribonuclease (ubiquitinização)	Desconhecido
<i>SIPA1L1</i>	14q24. 2	Via Wnt	Desconhecido
<i>B9D1</i>	17p11. 2	Ciliogênese/supressor tumoral	Hepatocarcinoma p53negativo
<i>DHODH</i>	16q22. 2	Síntese de pirimidinas	Ca Mama, LMA ⁵
<i>KIF13A</i>	6p22. 3	Cinesina/oncogene (?)	Retinoblastoma, ca próstata, ca bexiga, leucemias
<i>FBXL7</i>	5p15. 1	Apoptose/supressor tumoral	Ca Ovário
<i>THSD7B</i>	2q22. 1	Trombospodina/angiogênese	Ca Pulmão
<i>PTPN23</i>	3p21. 31	RTC/migração celular	Desconhecido
<i>RIMS2</i>	8q22. 3	Neurotransmissores	Tumores gliais
<i>ZIC4</i>	3q24	Função em Dedo de zinco	Ca Bexiga

1. Mantém a matriz extracelular 2. Fator de crescimento epidermal 3. Fator de necrose tumoral 4. Inibidor de apoptose. 5. Leucemia mielóide aguda

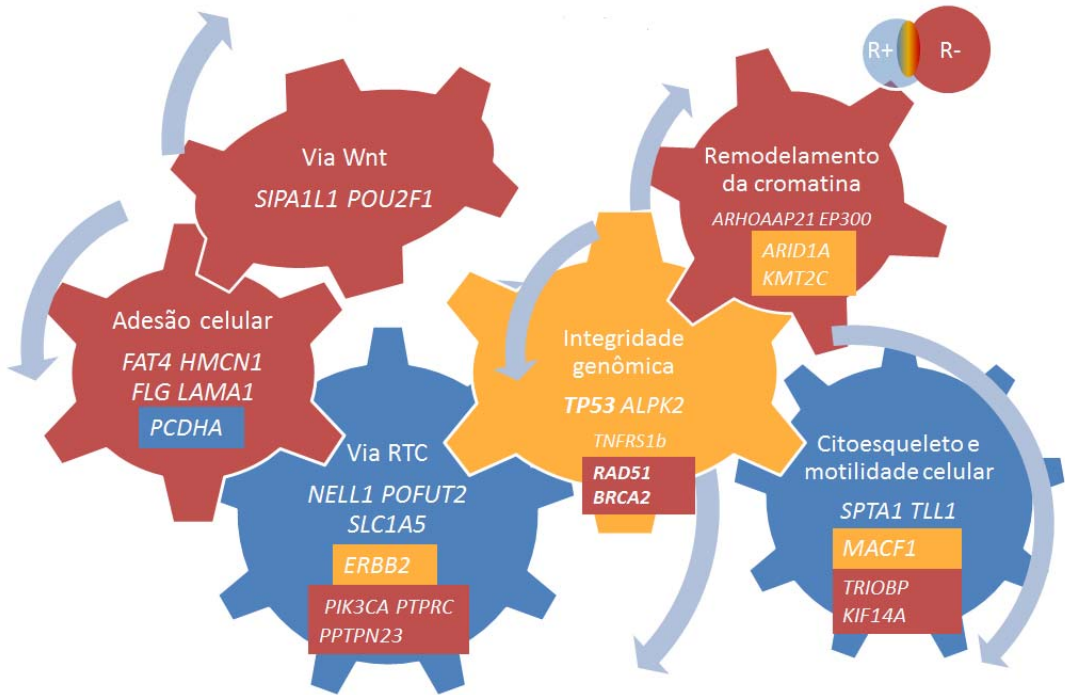


Figura 25 - Principais genes mutados com suas funções biológicas relacionadas ao perfil de resposta tumoral encontrada em cada grupo.

Tabela 28 - Genes mutados encontradas no grupo de pacientes respondedores (R+) entre subtipo difuso versus intestinal.

RESPOSTA R+	DIFUSO	INTESTINAL
	ARID1A	ALPK2
	MACF1	SPTA1
	TLL1	PKHD1
	PCNXL4	KMT2C
	SLC1A5	ERBB2
	POFUT2	TP53
		PCDHGA5

Tabela 29 - Genes mutados encontradas no grupo de pacientes não respondedores (R-) entre subtipo difuso versus intestinal.

RESPOSTA R-	DIFUSO	INTESTINAL
	KIF13A	HMCN1
	MUC6	PTPRC
	BRCA2	TP53
	FLG	FBXL7
	KMT2C	LAMA1
	PIK3CA	COL11A1
	RIMS2	ARHGAP21
	ZIC4	THSD7B

5 DISCUSSÃO

O câncer gástrico ainda é um dos tumores mais letais em todo mundo. Não obstante, ter ocorrido uma redução de incidência e menores índices de mortalidade dessa doença nos países desenvolvidos, ainda se configura um grande desafio na saúde pública, no Brasil e, particularmente, na região Nordeste e no Estado do Ceará. Um elevado volume de pacientes é diagnosticado em estádios localmente avançados, onde se impõe uma terapêutica multimodal, julgando-se que apenas a abordagem cirúrgica isolada é sabidamente ineficaz. Assim, a terapia perioperatória mostra sua importância em elevar as taxas de sobrevida do paciente, estando proporcional as taxas de regressão tumoral (YANG et al. 2015; BLACKHAM et al. 2016).

As condições clínicas iniciais dos pacientes também foram importantes marcadores prognósticos. Pacientes não obesos, sem anemia e sem disfagia desenvolveram maiores sobrevidas. Ressalta-se que na literatura a escala de ECOG é sempre um dos melhores preditores de resultados oncológicos (WANG J et al. 2016). No contexto perioperatório, a seleção dos pacientes os torna mais homogêneos, de forma que o ECOG não se mostrou um preditor prognóstico nessa casuística.

Não é consensual que tanto a avaliação da regressão tumoral quanto a classificação TNM utilizada pós-quimioterapia neoadjuvante ou perioperatória, revele-se um forte marcador prognóstico. O emprego de

diferentes classificações prejudica a uniformidade dos estudos. Em recente revisão feita por NEVES FILHO et al. (2016), a classificação de Becker parece ter melhor reprodutibilidade, aplicabilidade e impacto em SG para CG, distinto dos estudos de MANDARD et al. (1994) e NINOMIYA et al. (1999), obtidos com pequeno número de pacientes. Semelhante ao relatado por esse autor, o subtipo difuso e o grau elevado de diferenciação denotaram piores desfechos clínicos e de TRT. Contudo, em nossa casuística, os pacientes com disfagia (que são mais relacionados aos tumores proximais e de maiores volumes tumorais), alcançaram resultados inferiores em termos de SG. Nos estudos de BECKER et al. (2011) e REIM et al. (2012), os tumores proximais parecem responder com melhores TRT.

Estuda-se uma correlação entre o estadiamento TNM e a TRT em CG. O que se sabe é que, na maioria dos tumores, a resposta a QTneo impacta de forma considerável na sobrevida, sendo o “downstaging” e a regressão histológica importantes preditores de resultados clínicos positivos (FAREED et al. 2009; SCHMIDT et al. 2014). Em CG observa-se que a invasão da parede gástrica (critério T) e a presença de células tumorais residuais podem ter diferentes significados clínicos. Em nosso estudo, por exemplo, a paciente 34 apresentava estadiamento ypT3ypN0 e regressão tumoral de Becker grau 1b (pequenos “clusters” de células tumorais, em filete, até próximo à subserosa). O desfecho clínico dessa paciente muito mais relaciona-se a TRT do que ao TNM. Essa observação já foi descrita por SUÁREZ et al. (2008) e DAVIES et al. (2014) utilizando a classificação de Mandard em tumores de reto e de JEG, respectivamente. Em nossos

pacientes a avaliação de Becker não foi um bom preditor de resultados clínicos.

Em nosso estudo obtivemos uma taxa de regressão tumoral de 19,1% dos pacientes. As taxas de RPc ou Becker grau 1 são frequentemente baixas na maioria dos estudos, mesmo quando se utiliza esquemas com 2 ou mais drogas, como as antraciclinas, fluoropirimididas, platinas e taxanos, variando de 5 a 17%. O grupo de resposta parcial também necessita de avaliações prognósticas mais acuradas, pois é um grupo bastante heterogêneo em comportamento biológico. Considerando-se a gravidade da doença e os resultados da literatura, esse dado é consistente com outros estudos realizados, porém em sua maioria retrospectivos e com casuística limitada (BECKER et al. 2011; FUJITANI et al. 2012; LORENZEN et al. 2012; KOH et al. 2013).

Os eventos adversos apresentados por nossos pacientes durante a quimioterapia, de forma geral, foram manejáveis. Alguns desses são descritos de forma infrequente com a droga oral capecitabina. Três pacientes apresentaram oclusão vascular aguda em membros inferiores, ambos com carga tabágica elevada (> 15maços/ano), sexo masculino e sedentários. Existem relatos de cardiotoxicidade da capecitabina, entretanto, na literatura não há descrição de vasculopatia periférica aguda (FRICKHOFEN et al. 2002; WALKO et al. 2005). O uso combinado com a cisplatina também pode ter majorado esse grave evento, pois se trata de uma droga com potencial dano vascular, com relatos de fenômeno de Raynald's e vasculopatia (MOHOKUM et al. 2012; HERRMANN et al. 2016).

Deve-se relatar que a mortalidade pré-operatória foi considerada elevada, estando relacionadas à QT (neutropenia, insuficiência renal) ou não (evento vascular cerebral, leucemia aguda). As baixas condições sócio-econômicas podem ter colaborado com tais eventos, sendo a maioria pacientes provenientes do interior do Estado do Ceará, com dificuldades de transferência rápida à capital para um atendimento adequado.

Ressalta-se que pacientes operados mais precocemente obtiveram melhores desfechos em sobrevida. Atrasos de cirurgia determinam progressão de doença, prejudicando a avaliação de regressão tumoral nesses casos.

No que tange aos resultados imunoistoquímicos, é relevante ressaltar a correlação entre o *status* de expressão protéica do c-MET e dados de sobrevida e recaída. Na literatura, descreve-se uma prevalência entre 26 a 82,4% em IHQ e de 8,3 a 21,2% em amplificação gênica. Nessa casuística, a ausência de expressão de c-MET denotou SG superior, corroborando coma literatura que infere ser a presença de c-MET um marcador de mau prognóstico. Em meta-análise de PENG et al. (2014), relatou-se que a detecção do MET, seja por expressão imunoistoquímica ou por amplificação, correlacionou-se com piores prognósticos. Não houve diferenças significativas entre os estudos no que concerne a avaliação gênica ou protéica, embora ainda não se tenha um "guideline" que oriente a melhor avaliação patológica como ocorre, por exemplo, com o HER-2. Sabe-se que estratégias terapêuticas anti-MET tem evoluído de forma considerável, com drogas em uso no âmbito da pesquisa clínica, tais como rilotumumab e

onartuzumab (ambas anticorpos monoclonais anti-MET/HGF) e tivantinib (pequena molécula receptora tirosina cinase). No contexto neoadjuvante, estudos clínicos com essas drogas em pacientes c-MET positivos poderia denotar melhores taxas de resposta e regressão tumoral. Estudos de fase II e fase III estão em andamento, tanto no cenário paliativo quanto curativo, que ajudarão nesse questionamento (IVESON et al. 2014; KANG et al. 2014; ZHU et al. 2015; YUAN et al. 2016; CATENACCI et al. 2017).

Estudos inferem a importância da resposta imune tumoral correlacionado aos resultados clínicos mais favoráveis. Contudo no âmbito do tratamento perioperatório do CG, pouco se sabe sobre o tema, não havendo estudos que relacionem o papel do microambiente na resposta à PP. Em nossos pacientes, observou-se que a baixa infiltração por macrófagos (CD68 intratumoral e peritumoral) determinou melhores sobrevidas e regressão tumoral, com menos recaídas. Na maioria dos estudos, relata-se que os pacientes considerados de bom prognóstico, presumivelmente, apresentariam maior infiltração de linfócitos e de células dendríticas e queda da infiltração por células TREGS, marcada com FOXP3, e menor infiltração por TAM, porém são trabalhos retrospectivos e com diferentes protocolos de tratamento (SHEN et al. 2010; HU et al. 2014; LIU K et al. 2015, WANG XL et al. 2016). Em um estudo com 122 pacientes com CG, a expressão de FOXP3 correlacionou-se com maior risco de metástases linfonodais (WANG et al. 2010). Em nossas amostras, não se encontrou uma forte correlação entre a presença da expressão protéica de FOXP3 na

sobrevida e recidiva, podendo ser explicado pelo número pequeno de pacientes testados.

A plena dissecação da composição genética do CG tem se tornado uma importante recurso prognóstico e terapêutico. Aliado a isso, potenciais “druggable genes” no cenário de tratamento perioperatório do CGLA, geram uma crescente mudança de paradigma. Assim, realizou-se a avaliação do repertório de mutações somáticas por meio do sequenciamento de exoma completo de 11 amostras selecionadas.

Em nosso trabalho encontramos 43 genes mutados, sendo 10 exclusivos no grupo R+ 26 do grupo R- e 7 genes comuns aos dois grupos (Figura 24). Nos 3 casos de pacientes com RPc, as mutações mais frequentemente encontradas envolveram os genes seguintes: *PCDHGA5*, *TLL1*, *PCNXL4*, *ORIE2*, *SLCIA5*, *POFUT2*, *TNFRSF1b*, *NELL1*, *ABCA72* e *SPTA1*.

Dentre os chamados “drivers mutations” do CG, já foram descritos vários genes implicados na resposta ao tratamento para doença metastática, porém não há relatos de estudos de perfis mutacionais em pacientes sob tratamento perioperatório. Destes, destacam-se as mutações em genes relacionados a integridade genômica, organização do citoesqueleto, adesão célula-célula, motilidade celular, remodelamento da cromatina, sinalização via Wnt e de receptores de tirosina cinase (ZANG et al. 2012; LIN et al. 2015). Em destaque ao perfil respondendor, observou-se mutações nos genes relacionados à adesão celular (*PCDHA5*), manutenção do citoesqueleto (*TLL1*, *SPTA1*), ativação da via mTOR (*SLC1A5*), inativação da

apoptose (*TNFRS1b*) e possível ativação de receptores de tirosina cinase (*POFUT2*, *NELL1*). Nesse grupo, apenas o gene *NELL1* havia sido previamente reportado em CG, sendo os demais relatados de forma inédita para essa patologia.

Ressalta-se que 25 genes mutados em nossas amostras de CG não haviam sido descritos previamente. As funções biológicas destes genes ainda são pouco conhecidas e estão apresentadas na Tabela 27. Deve-se considerar que nem todas as mutações identificadas são necessariamente verdadeiras, uma vez que precisam ser validadas, mas seguramente alguns destes genes mutados podem ter papel chave em vias tumorigênicas ainda pouco conhecidas e, até mesmo, ser alvo terapêutico.

Desse grupo R+, descreve-se o *PCDHA5*, um membro da família das protocaderinas alfa ligadas ao cromossomo 5. Credita-se a esse gene a função de conexão célula-célula, especialmente no sistema nervoso central, porém é um gene ainda pouco conhecido (MORISHITA e YAGUI 2007).

O gene *TLL1* (*mammalian tolloid like-1*) codifica uma metaloproteinase dependente de zinco e que exercem um preponderante papel na manutenção da matriz extracelular e na regulação de fatores de crescimento, como o TGFbeta (TAKAHARA et al. 1996; BERRY et al. 2010; TROILO et al. 2016). Em modelos murinos, esse gene é ativado por estresse e em células de neuroblastoma e hepatocarcinoma, é ativado por hipóxia e induz carcinogênese (SABIRZHANOVA et al. 2009; MATSUURA et al. 2017). Nessa mesma função, o gene *SPTA1* (*spectrin alpha, erythrocytic 1*) está listado no grupo R+ e codifica a proteína espectrina, que une a

membrana celular à actina do citoesqueleto e determina a forma das células, a disposição das proteínas transmembranares e a organização das organelas (WONG e YAU2012). Em câncer de colon foi indicado como potencial biomarcador de progressão tumoral e de intervenção com drogas-alvo estágio-específicos (PALANIAPPAN et al. 2016).

O gene *SLC1A5* (*solute carrier family 1 member 5*) codifica um transportador de glutamine nas células tumorais, ativando a via mTOR. Observa-se que os processos envolvidos na captação da glutamina são essenciais ao ciclo celular e crescimento das células tumorais (DURÁN et al. 2012). Em câncer de cólon, a expressão aumentada desse gene relaciona-se a maiores estádios patológicos e à progressão tumoral (HUANG et al. 2014, LU et al. 2016).

Outro gene mutado nos casos com RPc ao tratamento perioperatório foi o *TNFRS1b* (*tumoral necrosis factor-receptor*, superfamília 1b), que codifica os receptores do fator de necrose tumoral (TNF), sendo responsável pelo recrutamento de 2 proteínas anti-apoptóticas (c-IAP1 e c-IAP2). Em câncer de cólon metastático, observou-se que esse gene, juntamente com outros avaliados, foi um bom preditor de quimioresistência ao fluorouracil, em um ensaio usando RT-PCR e expressão gênica (MATSUYAMA et al. 2006).

O gene *NELL1* (*neural EGF-like 1*) codifica fatores de crescimento epidermais, já bastante conhecidos na regulação do crescimento e diferenciação tumoral. Localiza-se no éxon 21 do cromossomo 11p15.1 e tem sido estudado como marcador de progressão de lesões benignas para

malignas em diferentes neoplasias (JIN et al. 2007; SHEN et al. 2015). Estudo feito por GAO et al. (2015) comparando-se os níveis de hipermetilação entre tumor e mucosa normal de CG, observou-se que ocorreu uma significativa diferença, com elevados níveis no tumor. Esse dado infere que a hipermetilação desse gene pode ter importância tanto na carcinogênese quanto servir de orientação para o diagnóstico precoce do CG. Em nossos pacientes respondedores, encontramos mutação tipo “frameshift”, distinta da já descrita em outros estudos.

Dos genes mais frequentemente mutados em comum aos grupos R+ e R- de pacientes, ressalta-se *TP53*, *ARID1A*, *ERBB2*, *MACF1*, *PKHD1*, *KMT2C* e *ALPK2*, observando-se que os 4 últimos genes nunca haviam sido reportados em CG. Esses genes participam das vias de integridade genômica (*TP53*, *ALPK2*), adesão celular (*MACF1*), ativação de RTC (*ERBB2*) e remodelamento da cromatina (*ARID1A* e *KMT2C*).

O gene *TP53* foi encontrado em 4 pacientes, todos do subtipo intestinal e 3 deles não responsivos ao tratamento. Foram duas mutações somáticas do tipo *missense* e duas com padrão LOF. A primeira leva a substituição de um aminoácido na proteína resultante. Já o tipo LOF gera um códon de parada prematuro na proteína resultante. Em ambas situações, a função da proteína p53 é prejudicada interferindo na regulação da parada do ciclo celular ou de recrutar os processos apoptóticos, especialmente quando induzidos por agentes quimioterápicos (potencial mecanismo de resistência a drogas). No cenário neoadjuvante, foi descrito que a expressão por IHQ de

p53 determina menores taxas de resposta, sendo um preditor independente de mau prognóstico (YASHIRO et al. 2009; QU e QU 2016).

Outro gene mutado apresentado em 3 pacientes foi o *MACF1* (*microtubule-actin crosslinking factor 1*), situado no éxon 110, cromossomo 1p34. 3. As mutações relatadas foram 1 paciente com LOF e 2 pacientes tipo *missense*, que resultam em proteínas anômalas. O *MACF1* pertence a família das plakinas e codifica uma grande proteína responsável por formar pontes no citoesqueleto, facilitando a interação actina-microtúbulo e assim determinando os processos celulares de adesão, migração e polarização das células (BOUAMEUR et al. 2014). É um regulador da via Wnt, que também atua na polaridade e migração celular, via beta-catenina, e estudos com *NGS* em câncer de cólon apontaram perfis mutacionais evolutivos entre sítio primário e metástases envolvendo esse gene, o que pode sugerir necessidade de novas biópsia no decorrer do tratamento desses pacientes (CHEN et al. 2006; KIM et al. 2015).

Disfunções no complexo de remodelamento da cromatina causam instabilidade genômica em muitos CG sem a mutação do *TP53*, com ênfase a mutação do gene *ARID1A*. Em CG essa mutação esteve relacionada a tumores com *MSI* e do tipo com infecção pelo EBV, que a semelhança do que ocorrem em câncer de colon, possuem melhor prognóstico (WANG K et al. 2011; ZANG et al. 2012). Tal observação foi notada no perfil do paciente 25, que teve RPc. Contrapondo-se a tais estudos, em meta-análise recente com mais de 3000 pacientes, perda da expressão de *ARID1A* avaliada por IHQ conferiu baixa SG em CG (YANG et al. 2016).

Um conhecido gene mutado em CG é o *ERBB2*, um importante alvo terapêutico no tratamento paliativo do CG, porém ainda não validado para tratamento perioperatório, inclusive mostrando não ser um fator prognóstico (LORDICK e RÖCKEN 2013; OKINES et al. 2013). Estudo clínico da aplicação de droga anti-HER-2 no cenário perioperatório do CG, descreveu-se que um dos papéis desse oncogene é ativar o fenótipo de TEM, com aumento da expressão de fatores transcricionais *SNAIL*, *SLUG*, *ZEB* e *Twist* e tal relação denota resistência à cisplatina, que foi revertida após a exposição ao tratamento com trastuzumabe (HUANG et al. 2016). A avaliação da amplificação desse gene (*ERBB2*) por metodologia de sequenciamento tem se mostrado uma ferramenta importante, e um estudo apontou que houve uma elevada concordância (de 98,4%), entre NGS, IHQ e FISH em 39 tumores gastroesofágico e 213 tumores de mama (ROSS et al. 2017). Ressalta-se que os pacientes do nosso estudo eram do subtipo intestinal e localização distal, porém com opostos graus de regressão tumoral. Especificamente, já se conhece drogas de ação nessa mutação, tais como trastuzumabe e lapatinibe, porém estudos em neoadjuvância ou tratamento perioperatório ainda não foram validados na prática clínica (WONG e YAU2012; HECHT et al. 2016; JANJIGIAN 2016; PRESS et al. 2017).

O gene *KMT2C* (*lisina metiltransferase 2C*) , presente nos pacientes 20 e 51, R- e R+, respectivamente, localiza-se no éxon 65 do cromossomo 7q36.1. Trata-se de um membro da família *MLL* (*myeloid/lymphoid leukemia*), também é conhecido como *MLL3*, cuja função relaciona-se ao

remodelamento da cromatina. Mutações tipo *missense* foram descritas como marcadores de risco para o desenvolvimento do CG (LIB et al. 2014). Pode ser inferido como um “targetable” gene (WADHWA et al. 2013).

Outro gene comum aos dois grupos de pacientes foi o *ALPK2* (*alfa cinase 2*), presente no éxon 17 do gene 18q21.31-q21.32, considerada uma região genômica crítica no CG. Esse gene tem a ação de inibição do *k-RAS*, além de ter atividade apoptótica e reguladora de expressão em genes de reparo do DNA, sendo importante no processo de evolução de adenoma para carcinoma, já previamente reportada em câncer de cólon (YOSHIDA et al. 2012). Estudo realizado em amostras tumorais e não tumorais de CG, além de linhagens celulares utilizando um painel de microarray e alteração no número de cópias do gene, evidenciou perda do número de cópias com hiperexpressão desse gene, sendo um potencial biomarcador (JUNILLA et al. 2010).

Numericamente mais genes mutados foram observados no grupo de pacientes não respondedores, não somente pela maior quantidade de pacientes, não obstante por também representar um grupo com maior complexidade e heterogeneidade. Dentre os genes mais frequentes em pacientes com Becker G3, destacam-se: *POU2F1*, *RAD51B*, *TRIOBP* e *DHODH*. Outras mutações de menor ocorrência em nossos pacientes, porém com importante papel em CG foram: *MUC6*, *BRCA2*, *HMCN1*, *FAT4*, *PIK3CA*, *FLG*, *PTPRC*, *LAMA1*, *COL11A1* e *EP300*. De forma geral, a adesão celular (*TRIOBP*, *FAT4*, *HMCN1* e *LAMA1*), reparo do DNA e apoptose defeituosa (*RAD51B*, *BRCA2*), quimiosensibilidade às

fluoropirimidinas (*DHODH*), proteção de mucosa (*MUC-6*), ativação da via Wnt (*POU2F1*), ativação da via Jak cinase (*PTPRC*), remodelamento da cromatina (*EP300*) e relacionados ao fenótipo tipo TEM e subtipo EBV-positivos (*PIK3CA*, *FLG*), foram as principais funções alteradas nesse perfil de prognóstico reservado. Desses genes, a mutação do *DHODH* nunca havia sido reportado em CG.

Em 3 pacientes, sendo 2 do tipo difuso e 1 intestinal, encontramos mutação no gene *POU2F1* (POU class 2 homeobox 1), alocado no éxon21 do cromossomo 1q24. 1 e membro da família de fatores de transcrição POU (STURM et al. 1993). Esse gene encontra-se expresso em tumores pouco diferenciados, como em células de CG difuso e foi observado um papel crítico desse gene na ativação da via Wnt, relacionada à polaridade, motilidade e adesão celular (KATOH e KATOH 2007). Observa-se então que a mutação desse gene pode ser alvo crítico nos tumores gástricos do tipo difuso (XU SH et al. 2015).

Um gene mutado em 3 pacientes com CG intestinal foi o *RAD51B* (*RAD51 paralog B*), presente no éxon 26 do cromossomo 14q24.1. Esse gene pertence à família RAD51, que atua como sensor de reparo ao DNA por recombinação homóloga. A inibição desse gene causa parada do ciclo celular em G1 e ativação de mecanismos apoptóticos (RODRIGUE et al. 2013). Avaliação por RT-PCR e microarray de amostras tumorais e não tumorais de pacientes com CG encontrou maiores estadiamentos, indiferenciação tumoral, maior acometimento linfonodal e metástases, com baixa sobrevida, em relação aos pacientes RAD51 negativos. A

superexpressão desse gene está associada a proliferação celular, droga-resistência e piores prognósticos (CHENGY et al. 2016). Esse gene se coloca com um possível biomarcador no CG.

Também em 3 pacientes com CG subtipo intestinal foi relatada mutação no gene *TRIOBP* (*TRIO and F-actin binding protein*), localizado no éxon 26 do cromossomo 22q13.1. Esse gene está envolvendo na organização da actina do citoesqueleto, na motilidade e crescimento celular, além de estabilizar a F-actina. Foi descrito em linhagens celulares de câncer de pâncreas que a mutação desse gene leva à formação filopodial e consequente capacidade de invasão tecidual (BAO et al. 2015). Sequenciamento de todo genoma de membros de uma família com câncer gástrico e de reto hereditários mostrou 12 SNPs variantes, dentre eles o *TRIOBP* (THUTKAWKORAPIN et al. 2016).

Ainda sobre as mutações mais frequentes no grupo Becker G3 do tipo intestinal, foi relatado o gene *DHODH* (diidro-oratato desidrogenase), alocado no éxon 11 do cromossomo 16q22.2. O produto desse gene é uma enzima associada ao transporte mitocondrial de elétrons, que é requerido para a síntese “de novo” das pirimidinas, podendo ser considerado um marcador de quimiossensibilidade às fluoropirimidinas (como o fluorouracil e a capecitabina), bem como no diagnóstico precoce de câncer (HAIL et al. 2006; YIN et al. 2017). Existem drogas que agem nessa via e induzem apoptose mediada por espécies reativas de oxigênio, como o fenretinide (N-4-hidroxifenil-retinamida), ainda estudada apenas em pesquisa clínica (HAIL et al. 2010; MUNIER-LEHMANN et al. 2013).

O gene *FAT4* (*atypical cadherin 4*) foi encontrado em 1 paciente do tipo intestinal e outro difuso, ambos classificados com Becker grau 3 e com mutações tipo *missense* (G/A) e *frameshift* (C/-), respectivamente. Sabe-se que metilações silenciadoras desse gene estão comumente relacionadas a infecções pelo *H. pylori*, oportunizando-se uma janela de discussão do processo de cancerização por mecanismos epigenéticos (ZANG et al. 2012).

O gene *MUC-6* (mucina 6) tem ganhado importância clínica nos últimos anos. Esse gene está alocado no éxon 33 do cromossomo 11p15.5 e codifica glicoproteínas de alto peso molecular que servem de barreira ao lúmen intestinal. Sua inativação acelera a injúria à mucosa gástrica e potencializa a carcinogênese, especialmente na progressão de adenoma para carcinoma (TANIYAMA et al. 2017). Está associado a maiores estágios tumorais e pior prognóstico e sua positividade por IHQ denota risco de progressão tumoral em lesões pré-malignas (ZHENG et al. 2006; JUNG et al. 2010). Em nosso estudo, o paciente com essa mutação era do subtipo difuso não respondedor.

Foi evidenciado em 1 paciente com CG intestinal a mutação do gene *HMCN1* (*hemicetin 1* ou *fibulina 6*), presente no éxon 107 do cromossomo 1q25.3-31.1. Este gene codifica as fibulinas, que estão implicadas na adesão celular, migração e proliferação. Existe elevada expressão de mRNA do *HMCN1* em tecido esplênico humano, e estudos indicam um papel na estabilização e na organização extracelular da epiderme (DE VEGA et al. 2009). Já foi descrita a mutação desse gene em tumores gástricos e colônicos (LEE SH et al. 2015).

Outra mutação descrita no paciente 20, com CG difuso e distal, foi do gene *BRCA2*, um conhecido gene supressor tumoral, que mantém a estabilidade genômica, especialmente via reparo da dupla hélice de DNA por recombinação homóloga. Aloca-se no éxon 27 do cromossomo 13q13.1, e está implicado na síndrome de câncer de mama-ovário hereditário. Também foi identificada recentemente uma mutação germinativa em família com CG hereditário (HANSFORD et al. 2015). Mutações somáticas *missense* desse gene foram encontradas estudando-se amostras tumorais e não tumorais de CG por meio do sequenciamento do exoma (ROKUTAN et al. 2016; HU et al. 2017). Na literatura, a mutação do *BRCA2* em CG relacionou-se com melhor prognóstico e resposta ao tratamento quimioterápico com cisplatina, sendo um potencial biomarcador (CHEN et al. 2015; DAS et al. 2016).

Um relevante gene mutado no paciente 48, com CG difuso, foi o *PIK3CA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*), presente no éxon 23 do cromossomo 3q26.32. A fosfatidil-inositol 3-quinase é composta de subunidades catalíticas e reguladoras e tem diversas funções, tais como crescimento celular, proliferação, diferenciação, mobilidade e sobrevivência (MILLIS et al. 2016). Em células de CG foi evidenciado a ação dessa via por meio do fator de transcrição “em dedo de zinco” 143, que ativa a via PI3K/AKT, relacionada ao fenótipo tumoral de TEM (LEI et al. 2013). A mutação desse gene em CG é descrita na classificação do “TCGA”, em 9% dos pacientes com o subtipo *EBV*-relacionado e de modo geral encontra-se mutado em 4 a 36% dos CG (WONG e YAU2012; DREYER et al. 2016). A amplificação desse gene

parece ser um evento mutuamente exclusivo com relação às mutações do *PTEN* na carcinogênese gástrica e está mais associado ao tipo difuso (BYUN et al. 2003; WONG e YAU 2012). Existem significativas diferenças genéticas entre os CG de orientais versus não-orientais, uma delas é a prevalência da mutação desse gene, que foi mais comum em caucasianos (18,52% & 9,6%, $p = 0,01$) (JIA et al. 2017).

Em 2 pacientes, um difuso e outro intestinal, foi referida mutação (tipo *missense* e *LOH*, respectivamente) no gene *FLG* (filagrina), posicionado no éxon 3 do cromossomo 1q21.3. Esse gene codifica uma proteína filamentosa intermediária que agrega filamentos de queratina na epiderme e participa da homeostase da pele (DI ZH et al. 2016). Polimorfismos na região rs2065955 desse gene foram relatadas em CG (KUANG et al. 2016).

No paciente 18, com CG intestinal e também portador de mutações nos genes já descritos *HMCN1* e *TP53*, foi determinada a mutação do gene *PTPRC* (*protein tyrosine phosphatase, receptor type C*), presente no éxon 34 do cromossomo 1q31.1-q32.1. O produto desse gene é um receptor transmembranar tirosina fosfatase envolvida com transformação oncogênica e regulador dos receptores de antígenos dos linfócitos B e T. Essa proteína interage com os proto-oncogenes da família *Scr* e com *Jak cinases*, que em estado ativado, sinalizam para a célula vários mecanismos de proliferação, invasividade, motilidade, resistência à apoptose e neoangiogênese (SUMMY et al. 2003; JU et al. 2009).

O gene *LAMA1* (*laminina subunit alfa 1*) está posicionado no éxon 64 do cromossomo 18p11. 31 e foi observado em 1 paciente com CG intestinal.

A laminina é abundante glicoproteína de matrix extracelular, cujo defeito reduz adesão célula-célula e denota maior tendência à migração e metástases (FULLÁR et al. 2015). CHOI et al. (2015) descreveu mutação tipo LOF em CG com perfil de instabilidade de microsatélite.

O gene *COL11A1* (cadeia alfa 1 do colágeno tipo XI), foi encontrado em 1 paciente com mutação tipo *missense*. Esse oncogene situa-se no éxon 21 do cromossomo 1p21.1. Hiperexpressão desse gene foram descritas em pólipos colônicos com transformação para carcinoma, distinguindo de forma acurada artefatos decorrentes do uso do eletrocautério utilizado na polipectomia colonoscópica (ZHANGD et al. 2016). Em células tumorais de CG que tiveram esse gene inibido demonstrou-se supressão do crescimento celular e invasão, além de parada do ciclo celular em G1, sendo considerado um alvo terapêutico em potencial (LIA et al. 2017).

Mutação tipo *missense* foi relacionada ao gene *EP300* (*E1A binding p300*), alocado no éxon 31 do cromossomo 22q13.2, em 1 dos nossos pacientes não respondedores com CG intestinal. A proteína codificada por esse gene tem atividade de histona acetiltransferase e age no remodelamento da cromatina, promovendo proliferação e diferenciação celular. Mutações tipo perda de função ligadas à proteína E1A do *EP300* foi encontrada em CG tipo *MSI* (CAMPBELL et al. 2004; KIM et al. 2013).

Nenhum trabalho anteriormente havia colocado o perfil mutacional como preditor de resultados patológicos em pacientes com CGLA. A despeito do pequeno número de pacientes avaliados, observou-se que diferentes vias tumorais estão implicadas nos dois grupos de pacientes com

prognósticos distintos, necessitando mais estudos com maior número de pacientes tratados com PP para validação de cada um desses genes descritos.

6 CONCLUSÕES

- 1 Os dados pertinentes à SG, SLD e cirurgia R0 desse estudos foram compatíveis com a literatura, demonstrando ser a poliquimioterapia perioperatória um estratégia de tratamento eficaz para o CGLA.
- 2 Não encontramos associação entre resposta completa e parcial pelos critérios de Becker com a sobrevida dos pacientes.
- 3 Obtivemos baixas taxas de toxicidade, morbimortalidade cirúrgica ao tratamento perioperatória nos esquema preconizados (EOX, ECX e CX), com uma boa aderência ao tratamento
- 4 O perfil mutacional em relação à resposta de pacientes com CGLA submetidos à poliquimioterapia perioperatória é complexo, com diferentes vias tumorais implicadas. Apresentamos 10 genes mutados do grupo respondedor, destacando a via a manutenção do citoesqueleto e 26 genes mutados no grupo não respondedor, estando implicada a via Wnt, via mTOR e integridade genômica. A mutação somática do *TP53* foi a mais comum, não estando associada com resposta ao tratamento
- 5 Ausência de expressão protéica de c-MET foi associadas bom prognóstico. Não encontramos associação prognóstica relacionadas expressão de HER-2.
- 6 A baixa expressão de CD68 foi associa a melhor prognóstico e melhores regressões tumorais. Não houve associação entre CD8 e FOXP3com regressão tumoral e sobrevida.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Rahman O. Targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway in gastric cancer: preclinical and clinical aspects. **Crit Rev Oncol Hematol** 2015; 93:18-27.

[ACS] American Cancer Society. **Cancer facts and figures 2016**. Available from: <URL:<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2016/cancer-facts-and-figures-2016.pdf>> [2017 fev 11].

Agolli L, Maurizi Enrici R, Osti MF. Adjuvant radiochemotherapy for gastric cancer: Should we use prognostic factors to select patients? **World J Gastroenterol** 2016; 22:1131-8.

Ajani JA, Mansfield PF, Lynch PM, et al. Enhanced staging and all chemotherapy preoperatively in patients with potentially resectable gastric carcinoma. **J Clin Oncol** 1999; 17:2403-11.

Al-Batran SE, Van Cutsem E, Oh SC, et al. Quality-of-life and performance status results from the phase III RAINBOW study of ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma. **Ann Oncol** 2016; 27:673-9.

Almeida PRC. **Imunoexpressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) e caderina-1 e no câncer gástrico: contribuição ao estudo da progressão tumoral-linfonodal**. Fortaleza; 2007. [Tese de Doutorado-Universidade Federal do Ceará].

Anderson MR, Harrison R, Atherfold PA, et al. Met receptor signaling: a key effector in esophageal adenocarcinoma. **Clin Cancer Res** 2006; 12:5936-43.

Angelov KG, Vasileva MB, Grozdev KS, Toshev SY, Sokolov MB, Todorov GT. The impact of the extent of surgical resection on survival of gastric cancer patient. **World J Gastroenterol** 2016; 22:1131-8.

Ayed DB, Khabir A, Abid M, et al. Clinicopathological and prognostic significance of p53, Ki-67, and Bcl-2 expression in Tunisian gastric adenocarcinomas. **Acta Histochem** 2014; 116:1244-50.

Ban S. Early and advanced gastric cancer. In: Tan D, Gregory YL, editors. **Advances in surgical pathology series: gastric cancer**. Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins: 2011. p. 73-93.

Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumabe in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER-2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. **Lancet** 2010; 376:687-97.

Bang Y, Kim YW, Yang HK, et al. Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer: results of the phase III CLASSIC trial [abstract]. **J Clin Oncol** 2011; 29: (18 suppl):LBA4002. [Presented at 2011 ASCO Annual Meeting; 2011 June 3-7, Chicago, IL, USA].

Baniak N, Senger JL, Ahmed S, Kanthan SC, Kanthan R. Gastric biomarkers: a global review. **World J Surg Oncol** 2016; 14:212.

Bao J, Wang S, Gunther LK, Kitajiri S, Li C, Sakamoto T. The actin-bundling protein TRIOBP-4 and -5 promotes the motility of pancreatic cancer cells. **Cancer Lett** 2015; 356:367-73.

Bartley NA, Washington MK, Colasacco C, et al. HER-2 testing and clinical decision making in gastroesophageal adenocarcinoma: guideline from the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. **Arch Pathol Lab Med** 2016; 140:1345-63.

Barzi A, Thara E. Angiogenesis in esophageal and gastric cancer: a paradigm shift in treatment. **Expert Opin Biol Ther** 2014; 14:1319-32.

Becker K, Mueller JD, Schulmacher C, et al. Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. **Cancer** 2003; 98:1521-30.

Becker K, Langer R, Reim D, et al. Significance of histopathological tumor regression after neoadjuvant chemotherapy in gastric adenocarcinomas: a summary of 480 cases. **Ann Surg** 2011; 253:934-9.

Begnami MD, Campos AHFJM, Silva E et al. Expressão imuno-histoquímica de c-erb-B2 e p53 em cacinomas gástricos. **J Bras Patol Med Lab** 2005, 41:279-86.

Begnami MD, Fukuda E, Fregnani JH, et al. Prognostic implications of altered human epidermal growth factor receptors (HERs) in gastric carcinomas: HER-2 and HER3 are predictors of poor outcome. **J Clin Oncol** 2011; 29:3030-6.

Berry R, Jowitt TA, Garrigue-Antar L, Kadler KE, Baldock C. Structural and functional evidence for a substrate exclusion mechanism in mammalian tolloid like-1 (TLL-1) proteinase. **FEBS Lett** 2010; 584:657-61.

Bilgin B, Sendur MA, Bülent Akıncı M, Şener Dede D, Yalçın B. Targeting the PD-1 pathway: a new hope for gastrointestinal cancers. **Curr Med Res Opin** 2017; 33:749-59.

Birkman EM, Ålgars A, Lintunen M, Ristamäki R, Sundström J, Carpén O. EGFR gene amplification is relatively common and associates with outcome in intestinal adenocarcinoma of the stomach, gastro-oesophageal junction and distal oesophagus. **BMC Cancer** 2016; 16:406.

Blackham AU, Greenleaf E, Yamamoto M, et al. Tumor regression grade in gastric cancer: predictors and impact on outcome. **J Surg Oncol** 2016; 114:434-9.

Boige V, Pignon J, Saint-Aubert B, Lasser P, Conroy T. Final results of a randomized trial comparing preoperative 5-fluorouracil (F)/cisplatin (P) to surgery alone in adenocarcinoma of stomach and lower esophagus (ASLE): FNLCC ACCORD07-FFCD 9703 trial [abstract]. **J Clin Oncol** 2007; 25 (18 suppl):4510. [Presented at 2007 ASCO Annual Meeting; 2007 June 1-5, Chicago, IL, USA].

Bouameur JE, Favre B, Borradori L. Plakins, a versatile family of cytolinkers: roles in skin integrity and in human diseases. **J Invest Dermatol** 2014; 134:885-94.

Brenkman HJ, Haverkamp L, Ruurda JP, van Hillegersberg R. Worldwide practice in gastric cancer surgery. **World J Gastroenterol** 2016; 22:4041-8.

Byun DS, Cho K, Ryu BK, et al. Frequent monoallelic deletion of PTEN and its reciprocal association with PIK3CA amplification in gastric carcinoma. **Int J Cancer** 2003; 104:318-27.

Cai J, Feng D, Hu L, et al. FAT4 functions as a tumour suppressor in gastric cancer by modulating Wnt/ β -catenin signalling. **Br J Cancer** 2015; 113:1720-9.

Calcagno DQ, Freitas VM, Leal MF, de SouzaCR, Demachki S, Montenegro R, Assumpção PP, Khayat AS, Smith Mde A, dos Santos AK, Burbano RR. MYC, FBXW7 and TP53 copy number variation and expression in gastric cancer. **BMC Gastroenterol.** 2013 Sep 23;13:141.

Campbell IG, Choong D, Chenevix-Trench G, Kathleen Cuninghame Foundation Consortium for Research into Familial Breast Cancer. No germline mutations in the histone acetyltransferase gene EP300 in BRCA1 and BRCA2 negative families with breast cancer and gastric, pancreatic, or colorectal cancer. **Breast Cancer Res** 2004; 6:R366-71.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature** 2014; 513:202-9.

Catenacci DV, Ang A, Liao WL et al. MET tyrosine kinase receptor expression and amplification as prognostic biomarkers of survival in gastroesophageal adenocarcinoma. **Cancer** 2017; 123:1061-70.

Chang HR, Nam S, Lee J, et al. Systematic approach identifies RHOA as a potential biomarker therapeutic target for Asian gastric cancer. **Oncotarget** 2016; 7:81435-51.

Chang SH, Kim SN, Choi HJ, et al. Adjuvant Chemotherapy for advanced gastric cancer in elderly and non-elderly patients: meta-analysis of randomized controlled trials. **Cancer Res Treat** 2017; 49:263-273.

Chen HJ, Lin CM, Lin CS, Perez-Olle R, Leung CL, Liem RK. The role of microtubule actin cross-linking factor 1 (MACF1) in the Wnt signaling pathway. **Genes Dev** 2006; 20:1933-45.

Chen K, Yang D, Li X, Sun B, et al. Mutational landscape of gastric adenocarcinoma in Chinese: implications for prognosis and therapy. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2015; 112:1107-12.

Chen S, Ou-Yang LY, Nie RC et al. Tumor Size Is a Critical Factor in Adjuvant Chemotherapy for T3-4aN0M0 Gastric Cancer Patients after D2 Gastrectomy. **Gastroenterol Res Pract** 2017; 2017:4928736.

Chen T, Xu XY, Zhou PH. Emerging molecular classifications and therapeutic implications for gastric cancer. **Chin J Cancer** 2016; 35:49.

Chen XL, Chen XZ, Yang C, et al. Docetaxel, cisplatin and fluorouracil (DCF) regimen compared with non-taxane-containing palliative chemotherapy for gastric carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One** 2013; 8:e60320.

Chen YC, Fang WL, Wang RF, et al. Clinicopathological variation of Lauren classification in gastric cancer. **Pathol Oncol Res** 2016; 22:197-202.

Cheng J, Fan XM. Role of cyclooxygenase-2 in gastric cancer development and progression. **World J Gastroenterol** 2013; 19:7361-8.

Cheng XJ, Lin JC, Tu SP. Etiology and prevention of gastric cancer. **Gastrointest Tumors** 2016; 3:25-36.

Cheng Y, Yang B, Xi Y, Chen X. RAD51B as a potential biomarker for early detection and poor prognostic evaluation contributes to tumorigenesis of gastric cancer. **Tumour Biol** 2016; 37:14969-78.

Choi MR, An CH, Yoo NJ, Lee SH. Laminin gene LAMB4 is somatically mutated and expressionally altered in gastric and colorectal cancers. **APMIS** 2015; 123:65-71.

Choi YY, Noh SH, Cheang JH. Molecular dimensions of gastric cancer: translational and clinical perspectives. **J Pathol Transl Med** 2016; 50:1-9.

Colle R, Cohen R, Cochereau D. Immunotherapy and patients treated for cancer with microsatellite instability. **Bull Cancer** 2017; 104:42-51.

Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. **Nat Med** 2015; 21:449-56.

Cunningham D, Allun WH, Stenning SP, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. **N Engl J Med** 2006; 355:11-20.

Cunningham D, Starling N, Rao S, et al. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. **N Engl J Med** 2008; 358:36-46.

Dantas AC, Santo MA, de Cleve R, Sallum RA, Cecconello I. Influence of obesity and bariatric surgery on gastric cancer. **Cancer Biol Med** 2016; 13:269-76.

Das K, Chan XB, Epstein D, et al. NanoString expression profiling identifies candidate biomarkers of RAD001 response in metastatic gastric cancer. **ESMO Open** 2016; 1:e000009

Davies AR, Gossage JA, Zylstra J, et al. Tumor stage after neoadjuvant surgery of adenocarcinoma of esophagus and esophagogastric junction. **J Clin Oncol** 2014; 32:2983-90.

Degiuli M, Sasako M, Ponti A, et al. Randomized clinical trial comparing survival after D1 or D2 gastrectomy for gastric cancer. **Br J Surg** 2014; 101:23-31.

Degiuli M, De Manzoni G, Di Leo A, et al. Gastric cancer: current status of lymph node dissection. **World J Gastroenterol** 2016; 22:2875-93.

Digklia A, Wagner AD. Advanced gastric cancer: Current treatment landscape and future perspectives. **World J Gastroenterol**. 2016 Feb 28; 22 (8):2403-14.

de Melo CF, Gígek CO, da Silva JN, et al. Association of COX2 gene hypomethylation with intestinal type gastric cancer in samples of patients from northern Brazil. **Tumour Biol** 2014; 35:1107-11.

de Souza CR, Leal MF, Calcagno DQ, Costa Sozinho EK, Borges Bdo N, Montenegro RC, Dos Santos AK, Dos Santos SE, Ribeiro HF, Assumpção PP, de Arruda Cardoso Smith M, Burbano RR. MYC deregulation in gastric cancer and its clinicopathological implications. **PLoS One**. 2013 May 22;8(5):e64420

de Vega S, Iwamoto T, Yamada Y. Fibulins: multiple roles in matrix structures and tissue functions. **Cell Mol Life Sci** 2009; 66:1890-902.

Di ZH, Ma L, Qi RQ, et al. Filaggrin and its processing proteases in human keratinocytes. **Chin Med J** 2016; 129:295-303.

Doi T, Muro K, Boku N, et al. Multicenter phase II study of everolimus in patients with previously treated metastatic gastric cancer. **J Clin Oncol** 2010 28:1904-10.

Donner I, Kiviluoto T, Ristimäki A, Aaltonen LA, Vahteristo P. Exome sequencing reveals three novel candidate predisposition genes for diffuse gastric cancer. **Fam Cancer** 2015; 14:241-6.

Dreyer C, Afchain P, Trouilloud I, André T. New molecular classification of colorectal cancer, pancreatic cancer and stomach cancer: towards "à la carte" treatment?]. **Bull Cancer** 2016; 103:643-50.

Durán RV, Oppliger W, Robitaille AM, et al. Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. **Mol Cell** 2012; 47:349-58.

Echizen K, Hirose O, Maeda Y, Oshima M. Inflammation in gastric cancer: Interplay of the COX-2/prostaglandin E2 and Toll-like receptor/MyD88 pathways. **Cancer Sci** 2016; 107:391-7.

Fareed KR, Ilyas M, Kaye PV, et al. Tumour regression grade (TRG) analyses in patients with resectable gastro-oesophageal adenocarcinomas treated with platinum-based neoadjuvant chemotherapy. **Histopathology** 2009; 55:399-406.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. **GLOBOCAN 2012 v1. 0**, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. <<http://globocan.iarc.fr>>[2016 Nov9].

Ferrer-Torres D, Nancarrow DJ, Kuick R, et al. Genomic similarity between gastroesophageal junction and esophageal Barrett's adenocarcinomas. **Oncotarget** 2016; 7:54867-82.

Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes. **Oncogene** 2017 Mar 13. [Epub ahead of print]

Fitzgerald RC, Hardwick R, Huntsman D, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. **J Med Genet** 2010; 47:436-44.

Fitzgerald TL, Efird JT, Bellamy N. Perioperative chemotherapy versus postoperative chemoradiotherapy in patients with resectable gastric/gastroesophageal junction adenocarcinomas: a survival analysis of 5058 patients. **Cancer** 2017 Apr 6. [Epub ahead of print]

Foo M, Leong T. Adjuvant therapy for gastric cancer: current and future directions. **World J Gastroenterol** 2014; 20:13718-27.

Frickhofen N, Beck FJ, Jung B, Fuhr HG, Andrasch H, Sigmund M. Capecitabine can induce acute coronary syndrome similar to 5-fluorouracil. **Ann Oncol** 2002; 13:797-801.

Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. **Lancet** 2014; 383:31-9.

Fujii S, Fujihara A, Natori KTEM1 expression in cancer-associated fibroblasts is correlated with a poor prognosis in patients with gastric cancer. **Cancer Med** 2015; 4:1667-78.

Fujitani K, Mano M, Hirao M, Kodama Y, Tsujinaka T. Posttherapy nodal status, not graded histologic response, predicts survival after neoadjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer. **Ann Surg Oncol** 2012; 19:1936-43.

Fullár A, Dudás J, Oláh L. Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression. **BMC Cancer** 2015; 15:256.

Fuse N, Kuboki Y, Kuwata T, Nishina T, et al. Prognostic impact of HER-2, EGFR, and c-MET status on overall survival of advanced gastric cancer patients. **Gastric Cancer** 2016; 19:183-91.

Gao C, Zhang Q, Kong D, Wu D, Su C, Tong J, Chen F, Zhang Q. MALDI-TOF mass array analysis of nell-1 promoter methylation patterns in human gastric cancer. **Biomed Res Int** 2015; 2015:136941.

Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. **Sci Signal** 2013; 6(269):pl1.

Gonzalez RS, Messing S, Tu X, McMahon LA, Whitney-Miller CL. Immunohistochemistry as a surrogate for molecular subtyping of gastric adenocarcinoma. **Hum Pathol** 2016; 56:16-21.

Grabsch H, Sivakumar S, Gray S, Gabbert HE, Muller W. HER-2 expression in gastric cancer: Rare, heterogeneous and of no prognostic value - conclusions from 924 cases of two independent series. **Cell Oncol** 2010; 32:57-65.

Gravalos C, Jimeno A. HER-2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. **Ann Oncol** 2008; 19:1523-9.

Guo G, He Z, Shi Z. Correlation between FOXP3 expression and gastric cancer. **Oncol Lett** 2016; 12:1554-8.

Ha TH, Kim BG, Jeong D, et al. Alcoholic liver disease is associated with an increased risk of gastric cancer. **Dig Dis Sci** 2017; 62:273-9.

Hail N Jr, Kim HJ, Lotan R. Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis. **Apoptosis** 2006; 11:1677-94.

Hail N Jr, Chen P, Kepa JJ, Bushman LR, Shearn C. Dihydroorotate dehydrogenase is required for N- (4-hydroxyphenyl)retinamide-induced reactive oxygen species production and apoptosis. **Free Radic Biol Med** 2010; 49:109-16.

Hansford S, Kaurah P, Li-Chang H, et al. Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 mutations and beyond. **JAMA Oncol** 2015; 1:23-32.

He C, Bian XY, Ni XZ, et al. Correlation of human epidermal growth factor receptor 2 expression with clinicopathological characteristics and prognosis in gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2013; 19:2171-8.

Hecht JR, Bang YJ, Qin SK, et al. Lapatinib in combination with capecitabine plus oxaliplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive advanced or metastatic gastric, esophageal, or gastroesophageal adenocarcinoma: TRIO-013/LOGiC--a randomized phase III trial. **J Clin Oncol** 2016; 34:443-51.

Heger U, Blank S, Wiecha C, et al. Is preoperative chemotherapy followed by surgery the appropriate treatment for signet ring cell containing adenocarcinomas of the esophagogastric junction and stomach? **Ann Surg Oncol** 2014; 21:1739-48.

Herrmann J, Yang EH, Iliescu CA, et al. Vascular toxicities of cancer therapies: the old and the new--an evolving avenue. **Circulation** 2016; 133:1272-89.

Hirahashi M, Koga Y, Kumagai R, Aishima S, Taguchi K, Oda Y. Induced nitric oxide synthetase and peroxiredoxin expression in intramucosal poorly differentiated gastric cancer of young patients. **Pathol Int** 2014; 64:155-63.

Howard JH, Hiles JM, Leung AM, Stern SL, Bilchik AJ. Race influences stage-specific survival in gastric cancer. **Am Surg** 2015; 81:259-67.

Huang F, Zhao Y, Zhao J, et al. Upregulated SLC1A5 promotes cell growth and survival in colorectal cancer. **Int J Clin Exp Pathol** 2014; 7:6006-14.

Huang D, Duan H, Huang H, et al. Cisplatin resistance in gastric cancer cells is associated with HER-2 upregulation-induced epithelial-mesenchymal transition. **Sci Rep** 2016; 6:20502.

Hu M, Li K, Maskey N, et al. Decreased intratumoral FOXP3⁺TREGs and increased dendritic cell density by neoadjuvant chemotherapy associated with favorable prognosis in advanced gastric cancer. **Int J Clin Exp Pathol** 2014; 7:4685-94.

Hu M, Qian C, Hu Z, Fei B, Zhou H. Biomarkers in tumor microenvironment? upregulation of fibroblast activation protein- α correlates with gastric cancer progression and poor prognosis. **OMICS** 2017; 21:38-44.

Hwang J. Beyond HER-2: recent advances and future directions in targeted therapies in esophagogastric cancers. **J Gastrointest Oncol** 2016; 7:763-70.

Iacovelli R, Pietrantonio F, Maggi C, de Braud F, Di Bartolomeo M. Combination or single-agent chemotherapy as adjuvant treatment of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis of published trials. **Crit Rev Oncol Hematol** 2016; 98:24-8.

Ibarrola-Villava M, Llorca-Cardenosa MJ, Tarazona N, et al. Deregulation of ARID1A, CDH1, cMET and PIK3CA and target-related microRNA expression in gastric cancer. **Oncotarget** 2015; 6:26935-45.

Iveson T, Donehower RC, Davidenko I, et al. Rilotumumab in combination with epirubicin, cisplatin, and capecitabine as first-line treatment for gastric or oesophagogastric junction adenocarcinoma: an open-label, dose de-escalation phase 1b study and a double-blind, randomised phase 2 study. **Lancet Oncol** 2014; 15:1007-18.

Izuishi K, Mori H. Recent Strategies for treating stage IV gastric cancer: roles of palliative gastrectomy, chemotherapy, and radiotherapy. **JGastrointestinal Liver Dis** 2016; 25:87-94.

Janjigian YY Lapatinib in gastric cancer: What is the LOGiCal next step? Lapatinib in gastric cancer: What Is the LOGiCal next step? **Clin Oncol** 2016; 34:40

Jhawer M, Coit D, Brennan M, et al. Perineural invasion after preoperative chemotherapy predicts poor survival in patients with locally advanced gastric cancer: gene expression analysis with pathologic validation. **Am J Clin Oncol** 2009; 32:356-62.

Ji YN, Wang Q, Li Y, Wang Z. Prognostic value of vascular endothelial growth factor A expression in gastric cancer: a meta-analysis. **Tumour Biol** 2014; 35:2787-93.

Jia YX, Li TF, Zhang DD, et al. The coexpression and prognostic significance of c-MET, fibroblast growth factor receptor 2, and human epidermal growth factor receptor 2 in resected gastric cancer: a retrospective study. **Oncotargets Ther** 2016; 9:5919-29.

Jia F, Teer JK, Knepper TC, et al. Discordance of somatic mutations between asian and caucasian patient populations with gastric cancer. **Mol Diagn Ther** 2017; 21:179-85.

Jiang L, Yang KH, Guan QL, Zhao P, Chen Y, Tian JH. Survival and recurrence free benefits with different lymphadenectomy for resectable gastric cancer: a meta-analysis. **J Surg Oncol** 2013; 107:807-14.

Jin Z, Mori Y, Yang J, et al. Hypermethylation of the nel-like 1 gene is a common and early event and is associated with poor prognosis in early-stage esophageal adenocarcinoma. **Oncogene** 2007; 26:6332-40.

Jin Z, Yoon HH. The promise of PD-1 inhibitors in gastro-esophageal cancers: microsatellite instability vs. PD-L1. **J Gastrointest Oncol** 2016; 7:771-788.

Jørgensen JT. Role of human epidermal growth factor receptor 2 in gastric cancer: biological and pharmacological aspects. **World J Gastroenterol** 2014; 20:4526-35.

Ju H, Lim B, Kim M, et al. A regulatory polymorphism at position -309 in PTPRCAP is associated with susceptibility to diffuse-type gastric cancer and gene expression. **Neoplasia** 2009; 11:1340-7.

Jung-Ho S, Kyu YW, Gou YK, et al. Expression of tumoral FOXP3 in gastric adenocarcinoma is associated with favorable clinicopathological variables and related with Hippo pathway. **Int J Clin Exp Pathol** 2015; 8:14608-18

Jung SH, Chung WC, Lee KM, et al. Risk factors in malignant transformation of gastric epithelial neoplasia categorized by the revised Vienna classification: endoscopic, pathological, and immunophenotypic features. **Gastric Cancer** 2010; 13:123-30.

Junnila S, Kokkola A, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Monni O. Genome-wide gene copy number and expression analysis of primary gastric tumors and gastric cancer cell lines. **BMC Cancer** 2010; 10:73.

Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, et al. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. **Nat Genet** 2014; 46:583-7.

Kang G, Hwang WC, Do IG, et al. Exome sequencing identifies early gastric carcinoma as an early stage of advanced gastric cancer. **PLoS One** 2013; 8:e82770.

Kang YK, Muro K, Ryu MH, et al. A phase II trial of a selective c-Met inhibitor tivantinib (ARQ 197) monotherapy as a second- or third-line therapy in the patients with metastatic gastric cancer. **Invest New Drugs** 2014; 32:355-61.

Karadayı N, Kandemir NO, Yavuzer D, Korkmaz T, Gecmen G, Kokturk F. Inducible nitric oxide synthase expression in gastric adenocarcinoma: impact on lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. **Diagn Pathol** 2013; 8:151.

Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. **cancer. Epidemiol Biomarkers Prev** 2014; 23:700-13.

Katoh Y, Katoh M. Conserved POU-binding site linked to SP1-binding site within FZD5 promoter: Transcriptional mechanisms of FZD5 in undifferentiated human ES cells, fetal liver/spleen, adult colon, pancreatic islet, and diffuse-type gastric cancer. **Int J Oncol** 2007; 30:751-5.

Katona BW, Rustgi AK. Gastric cancer genomics: advances and future directions. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol** 2017; 3:211-217.

Kawabe A, Shimada Y, Uchida S, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in primary and remnant gastric carcinoma: comparing it with p53 accumulation, *Helicobacter pylori* infection and vascular endothelial growth factor expression, **J Surg Oncol** 2002; 80:79-88.

Kelly CM, Janjigian YY. The genomics and therapeutics of HER-2-positive gastric cancer-from trastuzumab and beyond. **J Gastrointest Oncol** 2016; 7:750-62.

Kim JP, Lee JH, Kim SJ, Yu HJ, Yang HK. Clinico-pathologic characteristics and prognostic factors in 10783 patients with gastric cancer. **Gastric Cancer** 1998; 1:125-33.

Kim MA, Lee HS, Lee HE, Jeon YK, Yang HK, Kim WH. EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein over expression and high gene copy number. **Histopathology** 2008; 52:738-46.

Kim MS, Lee SH, Yoo NJ, Lee SH. Frameshift mutations of tumor suppressor gene EP300 in gastric and colorectal cancers with high microsatellite instability. **Hum Pathol** 2013; 44:2064-70.

Kim KJ, Lee KS, Cho HJ, et al. Prognostic implications of tumor-infiltrating FOXP3+ regulatory T cells and CD8+ cytotoxic T cells in microsatellite-unstable gastric cancers. **Hum Pathol** 2014; 45:285-93.

Kim R, Schell MJ, Teer JK, Greenawalt DM, Yang M, Yeatman TJ. Co-evolution of somatic variation in primary and metastatic colorectal cancer may expand biopsy indications in the molecular era. **PLoS One** 2015; 10:e0126670.

Kodera Y. The current state of stomach cancer surgery in the world. **Jpn J Clin Oncol** 2016 Aug 30. [Epub ahead of print].

Koh YW, Park YS, Ryu MH, et al. Postoperative nodal status and diffuse-type histology are independent prognostic factors in resectable advanced gastric carcinomas after preoperative chemotherapy. **Am J Surg Pathol** 2013; 37:1022-9.

Kong L, Yang N, Shi L, Zhao G, Wang M, Zhang Y. Total versus subtotal gastrectomy for distalgastric cancer: meta-analysis of randomized clinical trials. **Onco Targets Ther**2016; 9:6795-800.

Kuang X, Sun L, Liu S, et al. Association of single nucleotide polymorphism rs2065955 of the filaggrin gene with susceptibility to Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and EBV-negative gastric carcinoma. **Virol Sin** 2016; 31:306-13.

Lee J, Seo JW, Jun HJ, et al. Impact of *MET* amplification on gastric cancer: Possible roles as a novel prognostic marker and a potential therapeutic target. **Oncol Rep** 2011; 25:1517-24.

Lee JY, Son T, Cheong JH, et al. Association between chemotherapy-response assays and subsets of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer: a pilot study. **J Gastric Cancer** 2015; 15:223-30.

Lee SH, Je EM, Yoo NJ, Lee SH. HMCN1, a cell polarity-related gene, is somatically mutated in gastric and colorectal cancers. **Pathol Oncol Res** 2015; 21:847-8.

Lei Z, Tan IB, Deng N, et al. Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to PI3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil. **Gastroenterology** 2013; 145:554-65.

Li A, Li J, Lin J, Zhuo W, Si J. COL11A1 is overexpressed in gastric cancer tissues and regulates proliferation, migration and invasion of HGC-27 gastric cancer cells in vitro. **Oncol Rep** 2017; 37:333-40.

Li B, Liu HY, Guo SH, Sun P, Gong FM, Jia BQ. A *missense* mutation (S3660L) in MLL3 gene influences risk of gastric cancer. **J BUON** 2014; 19:394-7.

Li JQ, Yu XJ, Wang YC, et al. Distinct patterns and prognostic values of tumor-infiltrating macrophages in hepatocellular carcinoma and gastric cancer. **J Transl Med** 2017; 15:37.

Li K, Chen F, Xie H. Decreased FOXP3+ and GARP+ TREGS to neoadjuvant chemotherapy associated with favorable prognosis in advanced gastric cancer. **Onco Targets Ther** 2016; 9:3525-33.

Li T, Chen J, Liu QL, Huo ZH, Wang ZW. Meta-analysis: E-cadherin immunoexpression as a potential prognosis biomarker related to gastric cancer metastasis in Asian patients. **Eur Rev Med Pharmacol Sci** 2014; 18:2693-703.

Li Y, Liu Z, Liu H, et al. ERCC1 and ERCC2 variants predict survival in gastric cancer patients. **PLoS One** 2013; 8:e71994.

Lim CH, Cho YK, Kim SW, et al. The chronological sequence of somatic mutations in early gastric carcinogenesis inferred from multiregion sequencing of gastric adenomas. **Oncotarget** 2016; 7:39758-67.

Lin Y, Wu Z, Guo W, Li J. Gene mutations in gastric cancer: a review of recent next-generation sequencing studies. **Tumour Biol** 2015; 36:7385-94.

Liu J, Zhang C, Feng Z. Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. **Acta Biochim Biophys Sin** (Shanghai) 2014; 46:170-9.

Liu K, Yang K, Wu B, et al. Tumor-infiltrating immune cells are associated with prognosis of gastric cancer. **J Gastric Cancer** 2015; 15:223-30.

Liu Y, Lear T, Zhao Y, et al. F-box protein Fbxl18 mediates polyubiquitylation and proteasomal degradation of the pro-apoptotic SCF subunit Fbxl7. **Cell Death Dis** 2015; 6:e1630.

Lordick F, Röcken C. The identification of predictive factors for perioperative chemotherapy in esophago-gastric cancer. **Ann Oncol** 2013; 24:1135-8.

Lorenzen S, Blank S, Lordick F, Siewert JR, Ott K. Prediction of response and prognosis by a score including only pretherapeutic parameters in 410 neoadjuvant treated gastric cancer patients. **Ann Surg Oncol** 2012; 19:2119-27.

Lowy AM, Mansfield PF, Leach SD, et al. Response to neoadjuvant chemotherapy best predicts survival after curative resection of gastric cancer. **Ann Surg Oncol** 1999; 229:303-8.

Lu H, Li X, Lu Y, Qiu S, Fan Z. ASCT2 (SLC1A5) is an EGFR-associated protein that can be co-targeted by cetuximab to sensitize cancer cells to ROS-induced apoptosis. **Cancer Lett** 2016; 381:23-30.

Lui FH, Tuan B, Swenson SL, Wong RJ. Ethnic disparities in gastric cancer incidence and survival in the USA: an updated analysis of 1992-2009 SEER data. **Dig Dis Sci** 2014; 59:3027-34.

Lutz MP, Zalcborg JR, Ducreux M, et al. Highlights of the EORTC St. Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of gastric, gastroesophageal and oesophageal cancer - differential treatment strategies for subtypes of early gastroesophageal cancer. **Eur J Cancer** 2012; 48:2941-53.

Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. **N Engl J Med** 2001; 345:725-30.

Macdonald JS, Benedetti J, Smalley S, et al. Chemoradiation of resected gastric cancer: a 10-year follow-up of the phase III trial INT0116 (SWOG 9008) [abstract]. **J Clin Oncol** 2009; 27 (15 suppl):A4515. [Presented at 2009 ASCO Annual Meeting; 2009 May 29-June 02, Orlando, FL, USA].

Ma GF, Miao Q, Liu YM. High FOXP3 expression in tumour cells predicts better survival in gastric cancer and its role in tumour microenvironment. **Br J Cancer** 2014; 110:1552-60.

Ma SC, Zhao Y, Zhang T, Ling XL, Zhao D. Association between the ERCC1 rs11615 polymorphism and clinical outcomes of oxaliplatin-based chemotherapies in gastrointestinal cancer: a meta-analysis. **Onco Targets Ther** 2015; 8:641-8.

Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma: clinicopathologic correlations. **Cancer** 1994; 73:2680-6.

Mansour JC, Tang L, Shah M, et al. Does graded histologic response after neoadjuvant chemotherapy predict survival for completely resected gastric cancer? **Ann Surg Oncol** 2007; 14:3412-8.

Marano L, Boccardi V, Braccio B, et al. Comparison of the 6th and 7th editions of the AJCC/UICC TNM staging system for gastric cancer focusing on the "N" parameter-related survival: the monoinstitutional NodUs Italian study. **World J Surg Oncol** 2015; 13:215.

Marcinkevicius E, Zallen JA. Regulation of cytoskeletal organization and junctional remodeling by the atypical cadherin Fat. **Development** 2013; 140: 433-43.

Martin-Richard M, Gallego R, Pericay C, et al. Multicenter phase II study of oxaliplatin and sorafenib in advanced gastric adenocarcinoma after failure of cisplatin and fluoropyrimidine treatment. a GEMCAD study. **Invest New Drugs** 2013; 31:1573-9.

Martin-Romano P, Sola JJ, Diaz-Gonzalez JA, et al. Role of histological regression grade after two neoadjuvant approaches with or without radiotherapy in locally advanced gastric cancer. **Br J Cancer** 2016; 115:655-63.

Matsuura K, Sawai H, Ikeo K, et al. Genome-wide association study identifies TLL1 variant associated with development of hepatocellular carcinoma after eradication of Hepatitis C virus infection. **Gastroenterology** 2017; 152:1383-94.

Matsuyama R, Togo S, Shimizu D, et al. Predicting 5-fluorouracil chemosensitivity of liver metastases from colorectal cancer using primary tumor specimens: three-gene expression model predicts clinical response. **Int J Cancer** 2006; 119:406-13.

McCulloch P, Nita ME, Kazi H, Gama-Rodrigues JJ. WITHDRAWN: Extended versus limited lymph nodes dissection technique for adenocarcinoma of the stomach. **Cochrane Database Syst Rev** 2012; 1:CD001964.

Memon MA, Subramanya MS, Khan S, Hossain MB, Osland E, Memon B. Meta-analysis of D1 versus D2 gastrectomy for gastric adenocarcinoma. **Ann Surg** 2011; 253:900-11.

Merrett ND. Multimodality treatment of potentially curative gastric cancer: Geographical variations and future prospects. **World J Gastroenterol** 2014; 20:12892-99.

Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. **Nat Rev Genet** 2010; 11:31-46.

Meyerson M, Gabriel S, Getz G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. **Nat Rev Genet** 2010; 11:685-96.

Miceli R, Tomasello G, Bregni G, Di Bartolomeo M, Pietrantonio F. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer: current evidence and future challenges. **World J Gastroenterol** 2014; 20:4516-25.

Millis SZ, Ikeda S, Reddy S, Gatalica Z, Kurzrock R. Landscape of phosphatidylinositol-3-kinase pathway alterations across 19 784 diverse solid tumors. **JAMA Oncol** 2016; 2:1565-73.

Mingoll F, Gallego J, Orduña A, et al. Tumor regression and survival after perioperative MAGIC-style chemotherapy in carcinoma of the stomach and gastroesophageal junction. **BMC Surg** 2015; 15:66.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

Mocellin S, McCulloch P, Kazi H, Gama-Rodrigues JJ, Yuan Y, Nitti D. Extent of lymph node dissection for adenocarcinoma of the stomach. **Cochrane Database Syst Rev** 2015; (8):CD001964.

Mocellin S, Nitti D. Lymphadenectomy extent and survival of patients with gastric carcinoma: a systematic review and meta-analysis of time-to-event data from randomized trials. **Cancer Treat Rev** 2015; 41:448-54.

Mohokum M, Hartmann P, Schlattmann P. The association of Raynaud's syndrome with cisplatin-based chemotherapy - a meta-analysis. **Eur J Intern Med** 2012; 23:594-8.

Mo J, Luo M, Cui J, Zhou S. Prognostic value of ERCC1and ERCC2 gene polymorphisms in patients with gastric cancer receiving platinum-based chemotherapy. **Int J Clin Exp Pathol** 2015; 8:15065-71.

Morishita H, Yagi T. Protocadherin family: diversity, structure, and function. **Curr Opin Cell Biol** 2007; 19:584-92.

Munier-Lehmann H, Vidalain PO, Tangy F, Janin YL. On dihydroorotate dehydrogenases and their inhibitors and uses. **J Med Chem** 2013; 56:3148-67.

Muro K, Chung HC, Shankaran V, Geva R, Catenacci D et al. Pembrolizumab for patients with PD-L1-positive advanced gastric cancer (KEYNOTE-012): a multicentre, open-label, phase 1b trial. **Lancet Oncol**. 2016 Jun;17(6):717-726.

Nagatsuma AK, Aizawa M, Kuwata T, et al. Expression profiles of HER-2, EGFR, MET and FGFR2 in a large cohort of patients with gastric adenocarcinoma. **Gastric Cancer** 2015; 18:227-38.

[NCCN] National Comprehensive Cancer Network. **Gastric cancer: versão 2. 2017**. Available from: <URL:<http://www.NCCN.org>>. [2017 agosto 12].

Neves Filho E, de Sant'ana RO, Nunes LVSC, Pires APB, da Cunha MPSS. Histopathological regression of gastric adenocarcinoma after neoadjuvant therapy: a critical review. **APMIS** 2017; 125:79-84.

Newton AD, Datta J, Loaiza-Bonilla A, Karakousis GC, Roses RE. Neoadjuvant therapy for gastric cancer: current evidence and future directions. **J Gastrointest Oncol** 2015; 6:534-43.

Ni Q, Ji A, Yin J, Wang X, Liu X. Effects of Two Common Polymorphisms rs2910164 in miR-146a and rs11614913 in miR-196a2 on gastric cancer susceptibility. **Gastroenterol Res Pract** 2015; 2015:764163.

Ninomiya Y, Yanagisawa A, Kato Y, Kitagawa T, Ishihara S, Nakajima T. Histological indications of a favorable prognosis with far-advanced gastric carcinomas after preoperative chemotherapy. **J Cancer Res Clin Oncol** 1999; 125:699-706.

Noh SH, Park SR, Yang HK, Chung HC, et al. CLASSIC trial investigators. Adjuvant capecitabine plus oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): 5-year follow-up of an open-label, randomised phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2014; 15:1389-96.

O'Doherty M, Freedman ND, Hollenbeck AR, Schatzin A, Abnet CC. A prospective cohort study of obesity and risk of esophageal and gastric adenocarcinoma in the NIH-AARP Diet and Health study. **Gut** 2012; 61:1261-8.

Ohba R, Iijima K. Pathogenesis and risk factors for gastric cancer after *Helicobacter pylori* eradication. **World J Gastrointest Oncol** 2016; 8:663-72.

Ohri N, Garg MK, Aparo S, et al. *WHO* benefits from adjuvante radiation therapy for gastric cancer? A meta-analysis. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2013; 86:330-5.

Oki E, Zhao Y, Yoshida R, Egashira A, Ohgaki K, Morita M, Kakeji Y, Maehara Y. The difference in p53 mutations between cancers of the upper and lower gastrointestinal tract. **Digestion** 2009; 79 (Suppl 1):33-9.

Okines AF, Thompson LC, Cunningham D, et al. Effect of HER-2 on prognosis and benefit from peri-operative chemotherapy in early oesophago-gastric adenocarcinoma in the MAGIC trial. **Ann Oncol** 2013; 24:1253-61.

Olivieri EH, Franco Lde A, Pereira RG, Mota LD, Campos AH, Carraro DM. Biobanking practice: RNA storage at low concentration affects integrity. **Biopreserv Biobank** 2014; 12:46-52.

Palaniappan A, Ramar K, Ramalingam S. Computational identification of novel stage-specific biomarkers in colorectal cancer progression. **PLoS One** 2016; 11:e0156665.

Pantano F, Berti P, Guida FM, et al. The role of macrophages polarization in predicting prognosis of radically resected gastric cancer patients. **J Cell Mol Med** 2013; 17:1415-21.

Park DY, Han HS, Lauwers GY. Gastric carcinoma: classifications and morphologic variants. In: Tan D, Gregory YL, editors. **Advances in surgical pathology series: gastric cancer**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 53-72.

Peng L, Zhan P, Zhou Y, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in gastric cancer: a meta-analysis. **Mol Biol Rep** 2012; 39:9473-84.

Peng Z, Zhu Y, Wang Q, et al. Prognostic significance of MET amplification and expression in gastric cancer: a systematic review with meta-analysis. **PLoS One** 2014; 9:e84502.

Petrioli R, Roviello G, Zanotti L, et al. Epirubicin-based compared with docetaxel-based chemotherapy for advanced gastric carcinoma: A systematic review and meta-analysis. **Crit Rev Oncol Hematol** 2016; 102:82-8.

Petrova YI, Schecterson L, Gumbiner BM. Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. **Mol Biol Cell** 2016; 27:3233-44.

Postlewait LM, Squires MH, Kooby DA, et al. The prognostic value of signet-ring cell histology in resected gastric adenocarcinoma. **Ann Surg Oncol** 2015; 22 Suppl 3:S832-9.

Press MF, Ellis CE, Gagnon RC. HER-2 status in advanced or metastatic gastric, esophageal, or gastroesophageal adenocarcinoma for entry to the TRIO-013/LOGiC trial of lapatinib. **Mol Cancer Ther** 2017; 16:228-38.

Pyo JS, Kang G, Cho H. Clinicopathological significance and diagnostic accuracy of c-met expression by immunohistochemistry in gastric cancer: a meta-analysis. **J Gastric Cancer** 2016; 16:141-51.

Qu J, Qu X. The predictors of response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced gastric cancer. **Cancer Biomark** 2016; 17:49-54.

Rausei S, Ruspi L, Galli F, et al. Seventh tumor-node-metastasis staging of gastric cancer: five-year follow-up. **World J Gastroenterol** 2016; 22:7748-53.

Reim D, Gertler R, Novotny A, et al. Adenocarcinomas of the esophagogastric junction are more likely to respond to preoperative chemotherapy than distal gastric cancer. **Ann Surg Oncol** 2012; 19:2108-18.

Rodrigue A, Coulombe Y, Jacquet K, et al. The RAD51 paralogs ensure cellular protection against mitotic defects and aneuploidy. **J Cell Sci** 2013; 126:348-59.

Roggin KK, Posner MC. D3 or not D3 ... that is not the question. **Lancet Oncol** 2006; 7:279-80.

Rokutan H, Hosoda F, Hama N. Comprehensive mutation profiling of mucinous gastric carcinoma. **J Pathol** 2016; 240:137-48.

Ross DS, Zehir A, Cheng DT, et al. Next-generation assessment of human epidermal growth factor receptor 2 (ERBB2) amplification status: clinical validation in the context of a hybrid capture-based, comprehensive solid tumor genomic profiling assay. **J Mol Diagn** 2017; 19:244-54.

Roth A, Malbach R, Falk S, et al. Docetaxel-cisplatin-5FU (TCF) versus docetaxel-cisplatin (TC) versus epirubicin-cisplatin-5FU (ECF) as systemic treatment advanced gastric carcinoma (AGC): a randomised phase II trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK) [abstract]. **J Clin Oncol** 2004a; 22 (14 suppl):A4020. [Presented at 2004 ASCO Annual Meeting; 2004 June 5-8 2004; New Orleans, LA, USA].

Roth A, Malbach R, Fazio N, et al. 5-Fluorouracil as a protracted continuous intravenous infusion can be added to full-dose docetaxel (Taxotere), cisplatin in advanced gastric carcinoma: a phase I-II trial. **Ann Oncol** 2004b; 15:759-64.

Sabesan A, Petrelli NJ, Bennett JJ. Outcomes of gastric cancer resections performed in a high volume community cancer center. **Surg Oncol** 2015; 24:16-20.

Sabirzhanova IB, Sabirzhanov BE, Keifer J, Clark TG. Activation of mammalian Toll-like 1 expression by hypoxia in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Biochem Biophys Res Commun** 2009; 389:338-42.

Saeki N, Ono H, Sakamoto H, Yoshida T. Genetic factors related to gastric cancer susceptibility identified using a genome-wide association study. **Cancer Sci** 2013; 104:1-8.

Sakuramoto S, Sasako M, Yamaguchi T, et al. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. **N Engl J Med** 2007; 357:1810-20.

Sano T, Sasako M, Yamamoto S, et al. Gastric Cancer Surgery: morbidity and mortality results from a prospective randomized controlled trial comparing D2 and extended para-aortic lymphadenectomy-Japan Clinical Oncology Group Study 9501. **J Clin Oncol** 2004; 22:2767-73.

Santoro R, Ettorre GM, Santoro E. Subtotal gastrectomy for gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2014; 20:13667-80.

Saukkonen K, Rintahaka J, Sivula A, et al. Cyclooxygenase-2 and gastric carcinogenesis. **APMIS** 2003; 111:915-25.

Schmidt T, Sicic L, Blank S, et al. Prognostic value of histopathological regression in 850 neoadjuvantly treated oesophagogastric adenocarcinomas. **Br J Cancer** 2014; 110:1712-20.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Mol Biol** 2006; 7:3-16.

Shen J, LaChaud G, Khadarian K, et al. NELL-1 expression in benign and malignant bone tumors. **Biochem Biophys Res Commun** 2015; 460:368-74.

Shen Z, Zhou S, Wang Y, et al. Higher intratumoral infiltratedFOXP3+ Treg numbers andFOXP3+/CD8+ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. **J Cancer Res Clin Oncol** 2010; 136:1585-95.

Smalley SR, Benedetti JK, Haller DG, et al. Updated Analysis of SWOG-Directed Intergroup Study 0116: a phase III trial of adjuvant radiochemotherapy versus observation after curative gastric cancer resection. **J Clin Oncol** 2012; 30:2327-33.

Smyth EC, Fassan M, Cunningham D. Effect of Pathologic Tumor Response and Nodal Status on Survival in the Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy Trial. **J Clin Oncol** 2016; 34:2721-7.

Song P, Yin Q, Lu M, Fu BO, Wang B, Zhao Q. Prognostic value of excision repair cross-complementation group 1 expression in gastric cancer: A meta-analysis. **Exp Ther Med** 2015; 9:1393-400.

Songun I, Putter H, Kranenbarg EM, Sasako M, van de Velde CJ. Surgical treatment of gastric cancer: 15-year follow-up results of the randomised nationwide Dutch D1D2 trial. **Lancet Oncol** 2010; 11:439-49.

Sturm RA, Cassady JL, Das G, Romo A, Evans GA. Chromosomal structure and expression of the human OTF1 locus encoding the Oct-1 protein. **Genomics** 1993; 16:333-41.

Suárez J, Vera R, Balén E, et al. Pathologic response assessed by Mandard grade is a better prognostic factor than down staging for disease-free survival after preoperative radiochemotherapy for advanced rectal cancer. **Colorectal Dis** 2008; 10:563-8.

Suh JH, Won KY, Kim GY, et al. Expression of tumoral FOXP3 in gastric adenocarcinoma is associated with favorable clinicopathological variables and related with Hippo pathway. **PLoS One** 2015; 10:e0134122.

Summy JM, Gallick GE. Src family kinases in tumor progression and metastasis. **Cancer Metastasis Rev** 2003; 22:337-58.

Suzuki S, Ono N, Furusawa C, Ying BW, Yomo T. Comparison of sequencereads obtained from three next-generation sequencing platforms. **PLoS One** 2011; 6:e19534.

Takagi W, Terashima M. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer. **Gan To Kagaku Ryoho** 2016; 43:151-5.

Tahara T, Shibata T, Okamoto Y, et al. Mutation spectrum of TP53 gene predicts clinicopathological features and survival of gastric cancer. **Oncotarget** 2016; 7:42252-60.

Tan RYC, Ngeow J. Hereditary diffuse gastric cancer: What the clinician should know. **World J Gastrointest Oncol** 2015; 7:153-60.

Tang D, Liu CY, Shen D, et al. Assessment and prognostic analysis of EGFR, HER-2, and HER3 protein expression in surgically resected gastric adenocarcinomas. **Onco Targets Ther** 2014; 8:7-14.

Tang LH, Berlin J, Branton P, et al. **Protocol for the examination of specimens from patients with carcinoma of the stomach based AJCC/UICCTNM Ed 7.** 2013. Available from: <[http://www. cap. org/ShowProperty?nodePath=/UCMCon/Contribution%20Folders/WebContent/pdf/stomach-13protocol-3201. pdf](http://www.cap.org/ShowProperty?nodePath=/UCMCon/Contribution%20Folders/WebContent/pdf/stomach-13protocol-3201.pdf)>. [2017 fev 13].

Taniyama D, Taniyama K, Kuraoka K et al. Long-term follow-up study of gastric adenoma; tumor-associated macrophages are associated to carcinoma development in gastric adenoma. **Gastric Cancer** 2017 Mar 20. [Epub ahead of print]

Tanner M, Hollmen M, Junttila TT, et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumabe. **Ann Oncol** 2005; 16:273-8.

Takahara K, Brevard R, Hoffman GG, Suzuki N, Greenspan DS Characterization of a novel gene product (mammalian tolloid-like) with high sequence similarity to mammalian tolloid/bone morphogenetic protein-1. **Genomics** 1996 34:157-65.

ThiesS, Langer R. Tumor regression grading of gastrointestinal carcinomas after neoadjuvant treatment. **Front Oncol** 2013; 3:262.

Thutkawkorapin J, Picelli S, Kontham V, Liu T, Nilsson D, Lindblom A. Exome sequencing in one family with gastric- and rectal cancer. **BMC Genet** 2016; 17:41.

Troilo H, Bayley CP, Barrett AL, Lockhart-Cairns MP, Jowitt TA, Baldock C. Mammalian tolloid proteinases: role in growth factor signalling. **FEBS Lett** 2016; 590:2398-407.

Tseng YC, Tsai YH, Tseng MJ, et al. Notch2-induced COX-2 expression enhancing gastric cancer progression. **Mol Carcinog** 2012; 51:939-51.

Turati F, Tramacere I, La Vecchia C, Negri E. A meta-analysis of body mass index and esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. **Ann Oncol** 2013; 24:609-17.

Ulrich R, Ronellenfitch U, Schwarzbach M, et al. Perioperative chemo (radio)therapy versus primary surgery for resectable adenocarcinoma of the stomach, gastroesophageal junction, and lower esophagus. **Cochrane Database Syst Rev** 2013; 5:CD008107.

van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, et al. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. **J Clin Oncol** 2006; 24:4991-7.

van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, Haustermans K, Prenen H. Gastric cancer. **Lancet** 2016; 388:2654-64.

van der Post RS, Vogelaar IP, Carneiro F, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. **J Med Genet** 2015; 52:361-74.

Wadhwa R, Song S, Lee JS, Yao Y, Wei Q, Ajani JA. Gastric cancer-molecular and clinical dimensions. **Nat Rev Clin Oncol** 2013; 10:643-55.

Wagner AD, Grothe W, Haertingl J, Kleber G, Grothey A, Fleig WE. Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. **J Clin Oncol** 2006; 24:2903-9.

Wagner AD, Unverzagt S, Grothe W, et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer. **Cochrane Database Syst Rev** 2010; (3):CD004064.

Walko CM, Lindley C. Capecitabine: a review. **Clin Ther** 2005; 27:23-44.

Wang B, Xu D, Yu X, et al. Association of intra-tumoral infiltrating macrophages and regulatory T cells is an independent prognostic factor in gastric cancer after radical resection. **Ann Surg Oncol** 2011; 18:2585-93.

Wang DD, Chen YB, Pan K, et al. Decreased expression of the ARID1A gene is associated with poor prognosis in primary gastric cancer. **PLoS One** 2012; 7:e40364.

Wang J, Zhou XQ, Li JY, et al. Prognostic significance of ERCC1 expression in postoperative patients with gastric cancer. **Chin J Cancer Res** 2014; 26:323-30.

Wang J, Qu J, Li Z, et al. A prognostic model in metastatic or recurrent gastric cancer patients with good performance status *WHO* received first-line chemotherapy. **Transl Oncol** 2016; 9:256-61.

Wang K, Kan J, Yuen ST, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. **Nat Genet** 2011; 43:1219-23.

Wang K, Yuen ST, Xu J, et al. *WHOLE*-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. **Nat Genet** 2014; 46:573-82.

Wang LH, Su L, Wang JT. Correlation between elevated FOXP3 expression and increased lymph node metastasis of gastric cancer. **Chin Med J (Engl)** 2010; 123:3545-9.

Wang XL, Jiang JT, Wu CP. Prognostic significance of tumor-associated macrophage infiltration in gastric cancer: a meta-analysis. **Genet Mol Res** 2016; 15 (4).

Washington K. 7th edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Stomach. **Ann Surg Oncol** 2010; 17:3077-9.

[WHO] World Health Organization. **Cancer fact sheet**. Updated February 2017. Available from: <URL:<http://www.WHO.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. [2017 fev 11].

Wilke H, Muro K, Van Cutsem E, et al. RAINBOW Study Group. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2014; 15:1224-35.

Wong H, Yau T. Targeted therapy in the management of advanced gastric cancer: are we making progress in the era of personalized medicine? **Oncologist** 2012; 17:346-58.

Wu CW, Hsiung CA, Lo SS, et al. Nodal dissection for patients with gastric cancer: a randomised controlled trial. **Lancet Oncol** 2006; 7:309-15.

Xiong BH, Cheng Y, Ma L, Zhang CQ. An updated meta-analysis of randomized controlled trial assessing the effect of neoadjuvant chemotherapy in advanced gastric cancer. **Cancer Invest** 2014; 32:272-84.

Xu AM, Huang L, Liu W, Gao S, Han WX, Wei ZJ. Neoadjuvant chemotherapy followed by surgery versus surgery alone for gastric carcinoma: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **PLoS One** 2014; 9:e86941.

Xu SH, Huang JZ, Xu ML, et al. ACK1 promotes gastric cancer epithelial-mesenchymal transition and metastasis through AKT-POU2F1-ECD signalling. **J Pathol** 2015; 236:175-85.

Xu Y, Peng Z, Li Z, Li Y, Li Y, Shen L. Expression and clinical significance of c-Met in advanced esophageal squamous cell carcinoma. **BMC Cancer** 2015; 15:2-7.

Xu Z, Huo X, Ye H, Tang C, et al. Genetic mutation analysis of human gastric adenocarcinomas using ion torrent sequencing platform. **PLoS One** 2014; 9:e100442.

Yamamoto M, Rashid OM, Wong J. Surgical management of gastric cancer: the East vs. west perspective. **J Gastrointest Oncol** 2015; 6:79-88.

Yang L, Wei S, Zhao R, Wu Y, Qiu H, Xiong H. Loss of ARID1A expression predicts poor survival prognosis in gastric cancer: a systematic meta-analysis from 14 studies. **Sci Rep** 2016; 6:28919.

Yang Y, Yin X, Sheng L, Xu S, Dong L, Liu L. Perioperative chemotherapy more of a benefit for overall survival than adjuvant chemotherapy for operable gastric cancer: an updated Meta-analysis. **Sci Rep** 2015; 5:12850.

Yan Y, Wang LF, Wang RF. Role of cancer-associated fibroblasts in invasion and metastasis of gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2015; 21:9717-26.

Yashiro M, Inoue T, Nishioka N, Matsuoka T, Boland CR, Hirakawa K. Allelic imbalance at p53 and microsatellite instability are predictive markers for resistance to chemotherapy in gastric carcinoma. **Ann Surg Oncol** 2009; 16:2926-35.

Ychou M, Boige V, Pignon JP, et al. Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial. **J Clin Oncol** 2011; 29:1715-21.

Yeh TS, Wu CW, Hsu KW, et al. The activated Notch1 signal pathway is associated with gastric cancer progression through cyclooxygenase-2. **Cancer Res** 2009; 69:5039-48.

Yin S, Kabashima T, Zhu Q, Shibata T, Kai M. Fluorescence assay of dihydroorotate dehydrogenase that may become a cancer biomarker. **Sci Rep** 2017; 7:40670.

Yoshida S, Yamashita S, Niwa T, et al. Epigenetic inactivation of FAT4 contributes to gastric field cancerization. **Gastric Cancer** 2017; 20:136-45.

Yoshida Y, Tsunoda T, Doi K, et al. ALPK2 is crucial for luminal apoptosis and DNA repair-related gene expression in a three-dimensional colonic-crypt model. **Anticancer Res** 2012; 32:2301-8.

Yu S, Yu Y, Zhao N, Cui J, Li W, Liu T. C-Met as a prognostic marker in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One** 2013; 8:e79137.

Yuan DD, Zhu ZX, Zhang X, Liu J. Targeted therapy for gastric cancer: Current status and future directions (Review). **Oncol Rep** 2016; 35:1245-54.

Zang ZJ, Cutcutache I, Poon SL, et al. Exome sequencing of gastric adenocarcinoma identifies recurrent somatic mutations in cell adhesion and chromatin remodeling genes. **Nat Genet** 2012; 44:570-4.

Zhang D, Zhu H, Harpaz N. Overexpression of $\alpha 1$ chain of type XI collagen (COL11A1) aids in the diagnosis of invasive carcinoma in endoscopically removed malignant colorectal polyps. **Pathol Res Pract** 2016; 212:545-8.

Zhang Y, Ma B, Huang XT, Li YS, Wang Y, Liu ZL. Doublet versus single agent as second-line treatment for advanced gastric cancer: a meta-analysis of 10 randomized controlled trials. **Medicine (Baltimore)** 2016; 95:e2792.

Zhang Y, Kuchimanchi M, Zhu M, Doshi S, Hoang T, Kasichayanula S. Assessment of pharmacokinetic interaction between rilotumumab and epirubicin, cisplatin and capecitabine (ECX) in a Phase 3 study in gastric cancer. **Br J Clin Pharmacol** 2017; 83:1048-1055.

Zhang Z, Tang H, Lin J, et al. Clinicopathologic and prognostic significance of human epidermal growth factor receptor in patients with gastric cancer: An updated meta-analysis. **Oncotarget** 2017; 8:17202-15.

Zhao BW, Chen YM, Jiang SS, Chen YB, Zhou ZW, Li YF. Lymph node metastasis, a unique independent prognostic factor in early gastric cancer. **PLoS One** 2015; 10:e0129531.

Zhao JH, Gao P, Song YX, et al. Which is better for gastric cancer patients, perioperative or adjuvant chemotherapy: a meta-analysis. **BMC Cancer** 2016; 16:631.

Zheng H, Takahashi H, Nakajima T, et al. MUC6 down-regulation correlates with gastric carcinoma progression and a poor prognosis: an immunohistochemical study with tissue microarrays. **J Cancer Res Clin Oncol** 2006; 132:817-23.

Zhou J, Hayakawa Y, Wang TC, Bass AJ. RhoA mutations identified in diffuse gastric cancer. **Cancer Cell** 2014; 26:9-11.

Zhou ML, Kang M, Li GC, Guo XM, Zhang Z. Postoperative chemoradiotherapy versus chemotherapy for R0 resected gastric cancer with D2 lymph node dissection: an up-to-date meta-analysis. **World J Surg Oncol** 2016; 14:209.

Zhu M, Tang R, Doshi S, et al. Exposure-response analysis of rilotumumab in gastric cancer: the role of tumour MET expression. **Br J Cancer** 2015; 112:429-37.

Anexo 1 - Declaração de Helsinque

Recomendações orientativas aos médicos
da pesquisa biomédica envolvendo humanos
Adotada pela 18^a. Assembléia Médica Mundial,
Helsinque, Finlândia, junho de 1964,
e revisada pela 29^a. Assembléia Médica Mundial, Tóquio, Japão, outubro de
1975,
35^a. Assembléia Médica Mundial,
Veneza, Itália, outubro de 1983
pela 41^a. Assembléia Médica Mundial Hong Kong, setembro de 1989

INTRODUÇÃO

É missão do médico salvaguardar a saúde da população. Seu conhecimento e consciência são dirigidos para a realização desta missão.

A Declaração de Genebra da Associação Médica Mundial confirma esta obrigação do médico com as seguintes palavras: "A saúde do meu paciente será a minha primeira consideração", e o Código Internacional de Ética Médica declara que: "O médico deverá agir somente de acordo com o interesse do paciente quando o cuidado médico puder diminuir a condição física ou mental do paciente".

O objetivo da pesquisa biomédica envolvendo humanos deve ser: melhorar os procedimentos diagnósticos, terapêuticos ou profiláticos e a compreensão da etiologia e patogênese da doença.

Parte 1 do Anexo 1

Na prática médica atual a maior parte dos procedimentos terapêuticos, profiláticos ou de diagnósticos envolve riscos. Isto se aplica especialmente à pesquisa biomédica.

O progresso médico está baseado na pesquisa que nos últimos anos tem se baseado, em parte, no experimento envolvendo humanos.

No campo da pesquisa biomédica, uma distinção fundamental deve ser apontada entre a pesquisa médica cujo objetivo é essencialmente diagnóstico ou terapêutico para o paciente e a pesquisa médica cujo objetivo essencial é puramente científico e não implica em valor diagnóstico ou terapêutico direto para o indivíduo submetido à pesquisa.

Deve-se ter cuidado especial na condução de pesquisa que possa afetar o meio ambiente, assim como o bem-estar dos animais utilizados na pesquisa.

A Associação Médica Mundial preparou as seguintes recomendações como um guia para cada médico da pesquisa biomédica envolvendo humanos, dado o caráter essencial de que os resultados dos experimentos laboratoriais sejam aplicados em humanos a fim de que o conhecimento científico possa ajudar toda a população sofredora. Estas recomendações deverão ser revisadas no futuro. É preciso reforçar que os padrões abaixo estabelecidos são somente um guia para os médicos em todo o mundo. Os médicos não estão desobrigados das responsabilidades criminais, civis ou éticas estabelecidas pelas leis de seus próprios países.

Parte 2 do Anexo 1

I. PRINCÍPIOS BÁSICOS

1. A pesquisa biomédica envolvendo humanos deve obedecer aos princípios científicos aceitos largamente e deve estar baseada em

experimentos laboratoriais e animais, realizados adequadamente, sob conhecimento da literatura científica.

2. O esquema e a performance de cada procedimento experimental envolvendo humanos devem ser claramente estipulados em um protocolo experimental que deve ser submetido para consideração, comentários e orientação de uma comissão especialmente selecionada, independente do pesquisador e do patrocinador. Tendo-se o cuidado de que esta comissão esteja em conformidade com as leis e regulamentos do país em que a pesquisa está sendo realizada.
3. A pesquisa biomédica envolvendo humanos deve ser conduzida somente por pessoas cientificamente qualificadas e sob supervisão médica clinicamente competente. A responsabilidade pelo indivíduo deve sempre recair sobre pessoa com qualificações jurídicas e nunca no participante da pesquisa, mesmo que este último tenha dado o seu consentimento para se submeter ao estudo.
4. A pesquisa biomédica não pode ser legitimamente exercida a menos que a importância do objetivo seja proporcional aos riscos inerentes ao indivíduo.
5. Todo projeto de pesquisa biomédica que envolva humanos deve ser precedido de cuidadosa avaliação da comparação dos riscos previsíveis com os benefícios esperados para o indivíduo ou para outros. Os interesses do indivíduo devem sempre prevalecer sobre os interesses da ciência e da sociedade.

Parte 3do Anexo 1

6. O interesse do indivíduo de salvaguardar sua integridade deve ser sempre respeitado. Todo cuidado deve ser tomado para respeitar a privacidade do indivíduo e minimizar o impacto do estudo sobre a sua integridade física e mental e sobre a sua personalidade.
7. Os médicos devem se abster de se engajar em projetos de pesquisa envolvendo humanos a menos que estejam convencidos de que os

riscos envolvidos sejam previsíveis. Os médicos devem interromper qualquer investigação se os riscos sobrepujarem os benefícios potenciais.

8. O médico está obrigado a preservar a precisão dos resultados, na publicação dos resultados de sua pesquisa. Os relatórios de experimentos que não estejam de acordo com os princípios estabelecidos nesta Declaração não devem ser aceitos para publicação.
9. Em qualquer pesquisa envolvendo seres humanos, cada participante potencial deve ser adequadamente informado dos objetivos, métodos, prováveis benefícios e riscos potenciais do estudo e do desconforto que ele possa acarretar. O paciente deve estar informado da liberdade de se abster da participação no estudo, e de a qualquer momento retirar o seu consentimento da participação no estudo. O médico deve obter o consentimento informado, fornecido livremente pelo paciente, preferivelmente por escrito.
10. Quando da obtenção do consentimento informado para o projeto de pesquisa, o médico deve ser particularmente cuidadoso em verificar se o indivíduo tem uma relação de dependência para com ele (a) ou se está consentindo sob pressão. Neste caso o consentimento informado deve ser obtido por um médico que não esteja envolvido na pesquisa e que seja completamente independente de um vínculo oficial.

Parte 4 do Anexo 1

11. No caso de incompetência legal, o consentimento informado deve ser obtido do guardião legal de acordo com a legislação do país. Quando a capacidade física ou mental torna possível a obtenção do consentimento, ou quando o indivíduo for menor de idade, a permissão dada pelo parente ou responsável legal substitui a do indivíduo, de acordo com a legislação do país. Quando a criança (menor de idade), for capaz de dar o consentimento, também deve ser obtido, além daquele obtido do parente ou responsável legal.

12. O protocolo de pesquisa deve sempre conter informações acerca das considerações éticas envolvidas e deve indicar os princípios enunciados na presente Declaração.

II. PESQUISA MÉDICA COMBINADA COM CUIDADO PROFISSIONAL

(Pesquisa clínica)

1. No tratamento de uma pessoa doente o médico deve estar livre para usar novas medidas diagnosticas e/ou terapêuticas se no seu julgamento puder oferecer esperança de salvar a vida, restabelecer a saúde ou aliviar o sofrimento.
2. Os benefícios potenciais, riscos e desconforto de um novo método devem ser pesados em relação às vantagens dos melhores métodos em uso para diagnóstico ou tratamento.
3. Em qualquer estudo clínico, todo paciente, incluindo aqueles do grupo controle, se houver, deve estar assegurado dos melhores métodos diagnósticos e terapêuticos comprovados.
4. A recusa do paciente em participar do estudo nunca deve interferir no relacionamento médico-paciente.

Parte 5 do Anexo 1

5. Se obter o consentimento informado for considerado essencial pelo médico, as razões específicas desta decisão devem estar claramente colocadas no protocolo experimental para conhecimento da comissão independente (1,2).
6. O médico pode combinar pesquisa médica com cuidado profissional, se o objetivo for a aquisição de novos conhecimentos médicos, levando-se em conta que a pesquisa médica só é justificada pelo seu valor potencial diagnóstico ou terapêutico para o paciente.

III. PESQUISA BIOMÉDICA NÃO TERAPÊUTICA ENVOLVENDO INDIVÍDUOS HUMANOS

(Pesquisa biomédica não-clínica)

1. É dever do médico permanecer como protetor da saúde e da vida do indivíduo, na aplicação puramente científica da pesquisa médica realizada com seres humanos.
2. Os indivíduos devem ser voluntários, pessoas saudáveis ou pacientes cuja doença não esteja relacionada com o projeto da pesquisa.
3. O pesquisador, ou equipe de pesquisadores, devem interromper a pesquisa se julgarem que sua continuação possa ser perigosa para o indivíduo.
4. Em se tratando de pesquisa em seres humanos, o interesse da ciência e da sociedade nunca deve prevalecer sobre as considerações relacionadas com o bem-estar do indivíduo.

Anexo 2 - Índice de Karnofsky para *Performance Status*

- 100** Normal, sem queixas: sem evidência da doença.
- 90** Capaz de realizar atividade normal; sinais ou sintomas leves da doença.
- 80** Atividade normal com esforço, alguns sinais ou sintomas da doença.
- 70** Cuidados próprios, mas incapaz de realizar atividade normal ou trabalhar.
- 60** Requer assistência ocasional, mas é capaz de cuidar da maioria das necessidades pessoais.
- 50** Requer assistência considerável e cuidados médicos freqüentes.
- 40** Incapacitado; requer cuidados especiais e assistência.
- 30** Gravemente incapacitado; a hospitalização é indicada embora o óbito não seja iminente.
- 20** Muito doente; hospitalização e cuidados de suporte ativo necessários.
- 10** Moribundo.
- 0** Morto.

Parte 2 do Anexo 2

GRAU	Índice de ECOG para <i>Performance Status</i> *
0	Totalmente ativo e capaz de desempenhar todas as atividades de antes da doença sem restrições.
1	Apresenta restrições sob atividade física forçada, mas é ambulatorial e capaz de trabalhos leves ou de natureza sedentária, como de escritório.
2	Ambulatorial e capaz de se cuidar, mas incapaz de realizar atividades profissionais. Mais de 50% de tempo sob repouso durante 24h.
3	Capaz de se cuidar com limitações, confinado a cama ou cadeira por mais de 50% do dia.
4	Completamente incapacitado. Não se cuida sozinho. Totalmente confinado à cama ou cadeira.
5	Morte

* Oke, MM, Creec, RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. *Toxicity and response criteria of The Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol* 1982; 5:649-55.

Anexo 3 - Critérios de Toxicidade Comum do NCI

TOXICIDADE	Grau				
	0	1	2	3	4
Leucócitos	> 4,0	3,0 - 3,9	2,0 - 2,9	1,0 - 1,9	< 1,0
Plaquetas	D. L. N.	75,0 - Normal	50,0 - 74,9	25,0 - 49,9	<25,0
Hemoglobina	D. L. N.	10,0 - Normal	8,0 - 9,9	6,5 - 7,9	< 6,5
Granulócitos/ Segmentados	> 2,0	1,5 - 1,9	1,0 - 1,4	0,5 - 0,9	< 0,5
Linfócitos	> 2,0	1,5 - 1,9	1,0 - 1,4	0,5 - 0,9	< 0,5
Infecção	Ausente	Leve	Moderada	grave	com risco de vida
Náuseas	Ausente	capaz de comer ingestão razoável	ingestão significativa-mente diminuída, mas pode comer	sem ingestão significativa	---
Vômitos	Ausente	1 episódio em 24 h	2 - 5 episódios em 24 h	6 - 10 episódios em 24 h	> 10 episódios em 24 h ou com necessidade de suporte parenteral
Diarréia	Ausente	aumento 2 -3 evacuações/dia em relação ao pré- tratamento	aumento de 4- 6 evacuações/dia ou evacuações noturnas ou cólicas moderadas	aumento 7 -9 evacuações/dia ou incontinência, ou cólicas graves	aumento > 10 evacuações/dia, ou diarréia com sangue ou necessidade de suporte parenteral
Estomatite	Ausente	úlceras indolores, eritema ou inflamação leve	eritema, edema, ou úlcera dolorosos, mas pode comer	eritema, edema ou úlcera dolorosos, e não pode comer	exige suporte parenteral ou enteral

Parte 2 do Anexo 3

Grau					
TOXICIDADE	0	1	2	3	4
Creatinina	D. L. N.	< 1,5 x N	1,5 - 3,0 x N	3,1 - 6,0 x N	> 6,0 x N
Proteinúria	s/ alteração	1+ ou < 0,3g% ou < 3g/l	2 - 3+ ou 0,3 - 1,0 g% ou 3-10 g/l	4+ ou > 1,0 g% ou >10 g/l	síndrome nefrótica
Alopecia	sem queda	perda leve de cabelo	queda pronunciada ou total dos cabelos	---	---
Pulmonar	ausente ou sem alteração	assintomático com anormalidade nos TFP	dispnéia sob esforço significativo	dispnéia no nível normal de atividade	dispnéia em repouso
Disritmias Cardíacas	Ausente	assintomático, transitório, sem necessidade de terapia	recorrente ou persistente, sem necessidade de terapia	requer tratamento	requer monitoração; ou hipotensão, ou taquicardia ventricular ou fibrilação
Função Cardíaca	Ausente	assintomático, declínio da F. E. V. E. de repouso em menos de 20% do valor basal	assintomático, declínio da F. E. V. E. de repouso em mais de 20% do valor basal	I. C. C. leve, responsiva a terapia	I. C. C. grave ou refratária
Cardíaca - Isquemia	Ausente	achatamento da onda T não-específico	assintomático, alterações em, ST e onda T sugerindo isquemia	angina, sem evidência de infarto	infarto agudo do miocárdio
Hipertensão	ausente ou sem alteração	assintomático, aumento transitório > 20 mmHg (D) ou p/ > 150/100 se D. L. N. previamente. Não requer tratamento.	recorrente ou aumento persistente > 20 mmHg (D) ou p/ > 150/100 se D. L. N. previamente. Não requer tratamento.	requer tratamento	crise hipertensiva
Hipotensão	ausente ou sem alteração	alterações sem necessidade de terapia (incluindo hipotensão ortostática transitória)	requer reposição hídrica ou outra terapia, mas sem hospitalização	requer terapia e hospitalização, resolvendo até 48 horas após interrupção do agente	requer terapia e hospitalização por > 48 horas após interrupção do agente

D. L. N. : Dentro dos Limites do Normal

Parte 3 do Anexo 3

Grau					
TOXICIDADE	0	1	2	3	4
Neuro-Sensorial	ausente ou s/ alteração	parestesias leves, perda de reflexos do tendão profundo	perda sensorial objetiva leve a moderada, parestesias moderadas	perda sensorial objetiva grave ou parestesias que interferem com a função	---
Neuro-Motor	ausente ou sem alteração	fraqueza subjetiva; s/ observações objetivas	fraqueza objetiva leve sem perda grave de função	fraqueza objetiva com comprometimento de função	paralisia
Neuro-Audição	ausente ou sem alteração	assintomático, perda de audição somente na audiometria	Tinido	perda de audição interferindo com a função, mas corrigível com aparelho auditivo	surdez incorrigível
Neuro-Visão	ausente ou sem alteração	---	---	sintomático, perda de visão sub-total	cegueira
Pele	ausente ou sem alteração	mácula dispersa ou erupção papular ou eritema assintomático	mácula dispersa ou erupção papular ou eritema c/ prurido ou outros sintomas associados	máculas, pápulas ou erupções vesiculares sintomáticas generalizadas	dermatite esfoliativa ou ulcerativa
Síndrome mão-pé (eritrodismestesia palmo-plantar)	Ausente	Dermatite mínima (eritema, edema ou hiperqueratose sem dor, não impede a realização da atividade normal	eritema doloroso e edema das mãos e/ou pés e/ou desconforto, afeta a atividade diária	descamação úmida, ulceração, formação de vesículas e dor intensa nas mãos e/ou pés e/ou intenso desconforto, incapacita para trabalhar ou efetuar as atividades diárias	---
Isquemia periférica	Ausente	Breve (<24 horas) episódio de isquemia gerida não-cirurgicamente e sem déficit permanente	Recorrente ou prolongado (>= 24Hrs) e / ou invasivo	com risco de vida, dano ao órgão terminal; urgente, intervenção cirúrgica indicada	morte

D. L. N. : Dentro dos Limites do Normal

Anexo 4 - Consentimento Pós-Informado

Hospital Haroldo Juaçaba
Instituto do Câncer do Ceará-ICC
Rua Papi Junior 1222
Fortaleza-CE CEP 60430-230

Este formulário de consentimento contém informações a respeito do tratamento que está sendo proposto para você pelo seu médico. Uma vez compreendido o plano de tratamento e havendo o seu interesse em participar do mesmo, será solicitada a sua assinatura no Consentimento pós-informado. Você receberá uma cópia para seu arquivo. Se você achar adequado, consulte outros profissionais (médicos ou não) antes de assinar este documento.

Proposta e plano de tratamento

O tratamento convencional das neoplasias malignas de estômago localmente avançados até alguns anos atrás consistia na retirada cirúrgica do estômago, seguida por quimioterapia com 5-Fluorouracil e leucovorin, associada à radioterapia. Esse tratamento demonstrou ser eficaz em pacientes submetidos a um tratamento cirúrgico menos radical e foi associada à freqüente incidência de vários efeitos colaterais, como diarreia e imunossupressão severas. Mesmo com esse tratamento muitos pacientes falecem em decorrência das recidivas, geralmente em outros órgãos como fígado, cavidade peritoneal e pulmão dessa neoplasia. Hoje há disponíveis drogas bem mais ativas em câncer gástrico que administradas antes e depois da cirurgia, permitem uma maior possibilidade de ressecção curativa (sem deixar resquícios do tumor), controle de metástases e, por conseqüência de sobrevida. Algumas dessas drogas quando aplicadas antes da realização da cirurgia, diminuíram a mortalidade dos pacientes quando comparados aqueles que só fizeram a cirurgia.

Esse estudo pretende a realização do tratamento do seu tumor, utilizando uma combinação de quimioterapia e cirurgia, visando aumentar a chance de seu tumor ser retirado com margens de segurança, destruir resquícios de células cancerígenas que estejam circulando em seu sangue (metástases) e diminuir a chance de recaídas e de morte pela doença. O estudo se baseia em experiências semelhantes realizadas na Europa e respaldadas e aceitas em outros continentes. Tem como principal objetivo estabelecer uma relação entre a magnitude da diminuição do tumor após a Quimioterapia com as características genéticas e protéicas dele. Para isso, necessita-se de uma série de análises moleculares no material colhido em biópsias de seu estômago. Portanto torna-se necessário que você se submeta a uma coleta de amostras do seu tumor e do tecido gástrico normal através de endoscopia digestiva alta (mesmo que você já tenha realizado esse exame em outro serviço). Será também retirado volume de 10ml de sangue antes do tratamento para avaliarmos se há presença de substâncias que indicam uma resposta do organismo à presença da neoplasia. Esse tipo de estudo busca identificarmos marcadores da agressividade, de chance de recidiva e de resposta às drogas atualmente disponíveis para esse tipo de neoplasia. Tal conhecimento seria fundamental no tratamento e condução de casos como o seu no futuro.

Parte 1 do Anexo 4

Você será submetido inicialmente a uma avaliação que consistirá na realização de exames laboratoriais, radiológicos (Raios X, Tomografia, ecocardiografia ou cintilografia do coração). No caso de não se detectarem evidências de que seu tumor tenha se disseminado além do estômago e linfonodos regionais e que você não apresente qualquer problema de saúde que contraindique quaisquer dos tratamentos propostos, você iniciará o tratamento.

A primeira fase do tratamento consistirá de 03 aplicações de quimioterapia, que envolverão as drogas: **Epirrubicina** (uma vez a cada três

semanas por via venosa), **Cisplatina e/ou Oxaliplatina** (uma vez a cada três semanas por via venosa) e **Capecitabina** (por via oral por 14 dias a cada 21 dias).

Os possíveis efeitos tóxicos do tratamento incluem: aftas orais (com dificuldade variável para deglutição), diarreia, náuseas e vômitos, queda de cabelo, queda nos glóbulos sanguíneos (responsáveis pelas suas defesas, coagulação e oxigenação dos tecidos), sendo mais comuns e potencialmente graves as infecções que ocorrem durante esse período de queda. Por fim, existe a possibilidade de ocorrerem sintomas decorrentes de “neuropatia periférica”, que incluem formigamento, dor em queimação, dores musculares e raramente, fraqueza muscular. Há possibilidade (cerca de 2%) ainda de diminuição com ou sem consequências clínicas da função cardíaca. Muitos dos exames de avaliação realizados antes e durante o estudo têm como objetivo o controle e prevenção de muitas dessas complicações.

Após a conclusão dessa primeira fase você poderá ser reavaliado com novos exames (laboratoriais e radiológicos) e caso permaneça sem evidências de metástases, você será submetido a uma cirurgia para a retirada completa ou parcial do estômago e gânglios linfáticos próximos a esse órgão. Esse procedimento será realizado aproximadamente quatro semanas após o término da quimioterapia. Essa cirurgia será realizada em você seguindo as diretrizes do serviço de cirurgia abdominal desse hospital. É possível que o fato de você ter sido submetido à quimioterapia possa aumentar as complicações usuais (atraso de cicatrização e infecções do local da cirurgia) desse tipo de cirurgia, embora, o prazo de 4 semanas tenha sido seguro na maioria dos pacientes submetidos a essa abordagem em relatos de literatura.

Parte 2do Anexo 4

Após a recuperação dessa cirurgia, você concluirá seu tratamento com mais três ciclos de quimioterapia com as drogas anteriormente utilizadas.

Permanecerá após isso, sob acompanhamento ambulatorial periódica por pelo menos cinco anos (prática rotineiramente utilizada em casos de câncer gástrico operado).

Plano de tratamento

Fase inicial:

Cisplatina - 75 mg/m² EV em 2 horas com hidratação forçada, no primeiro dia de cada ciclo, a cada três semanas, por três ciclos (2 a 3 meses, aproximadamente). **ou**

Oxaliplatina – 85mg/m² EV em 2horas

Capecitabina – 1250g/m²/dia divididos em 2 tomadas ao dia continuos a cada 21 dias (ou seja, por 2 a 3 meses, aproximadamente).

Epirrubicina - 50 mg/m² EV (na veia) em 1 hora, no primeiro dia de cada ciclo, a cada 3 semanas por três ciclos (2 a 3 meses, aproximadamente). Essa última droga poderá nao ser indicada em casos selecionados, que tenha restrição a esse medicamento

Segunda fase:

Gastrectomia (retirada do estômago) total ou parcial associada a esvaziamento linfonodal radical (retirada de gânglios linfáticos) (cirurgia de rotina para câncer gástrico no Hospital do Câncer do Ceará e Hospital Geral de Fortaleza).

Terceira fase: Quimioterapia igual à primeira fase por 3 ciclos.

Exames durante e após o tratamento

Todos os pacientes serão acompanhadas regularmente pelo médico assistente. Durante o período de quimioterapia e após seu término, exames periódicos de sangue, urina, raios X e tomografia, serão realizados para a

avaliação da sua doença ou caso o principal investigador do protocolo julgue necessária à realização de outros exames baseado na sua evolução.

Benefícios

Muito embora esse tipo de tratamento traga mais benefícios aos pacientes submetidos a ela, não se pode dizer que você, com certeza, será um dos beneficiados. Protocolos de pesquisa são baseados na análise de grandes populações estudadas, sendo impossível determinar qual indivíduo recrutado obterá o benefício. Os resultados desse tipo de estudo que lhe está sendo proposto são importantes e relevantes nessa patologia, mas ainda necessitarão ser validados em outros estudos mais complexos antes de poderem ser aplicados a população geral com câncer gástrico. Você não terá nenhum tipo de remuneração financeira ao aceitar este tratamento. Não existe nenhum tipo de indenização para complicações ou seqüelas causadas pelo tratamento.

Parte 3 do Anexo 4

Custo Financeiro

Uma vez que a realização desse tipo de tratamento já considerado rotina (ou seja independente de fazer parte do estudo a quimioterapia já é a principal indicação para o seu caso) em nosso serviço e em outros centros oncológicos, o custo do tratamento será de responsabilidade primária do paciente ou de seu seguro de saúde (plano de saúde ou Sistema Único de Saúde). Algumas das drogas utilizadas fazem parte de doação de iniciativa privada como forma de incentivo à pesquisa. Os custos relativos aos aspectos experimentais que são o principal objetivo desse estudo (estudos genéticos) serão de nossa responsabilidade, através de financiamento de instituições de apoio a pesquisa junto ao ICC e Hospital AC Camargo-SP. Os procedimentos envolvidos com a terapia que não normalmente

reembolsados pelos convênios de saúde, incluindo SUS, como cateteres e bombas infusoras, se assim necessários serão custeados com verba das agências de fomento (já solicitadas).

Direito de recusar e de se retirar do tratamento.

A escolha de entrar ou não neste tratamento é inteiramente sua. Seu médico deve ter explicado que além da proposta nesse estudo, existem outras opções terapêuticas também respaldadas cientificamente para sua doença. Caso você se recuse a participar deste estudo, você será tratada com a mesma abordagem ou com uma dessas outras opções sem nenhum tipo de preconceito pelo seu médico. Você tem o direito de se retirar deste estudo a qualquer momento. Se você decidir se retirar do estudo, você será tratada de maneira convencional pelos mesmos médicos, sem nenhum tipo de preconceito.

Amostras de tecido para análises genéticas

Como já citado esse estudo busca o conhecimento das alterações do material genético que compõe as células do seu tumor de forma a tentar identificar um perfil de comportamento de neoplasias como a sua. Esse conhecimento terá impacto na melhor definição do melhor tratamento a ser administrado para pessoas com o seu mesmo problema. O material coletado do seu tumor através de endoscopia e de seu sangue será armazenado e, em seguida, processado nessa Instituição sob identificação que só será acessada pelos pesquisadores autorizados para esse projeto. Não será permitida a consulta ou divulgação de seus dados pessoais individuais, nem de prontuários ou dos resultados das análises aqui previstas para terceiros, incluindo empregadores e empresas seguradoras em qualquer hipótese. Caso após o processamento e estudo desse material, ainda restar qualquer amostra sua, essa será armazenada em condições adequadas, sob sigilo e não poderá ser utilizada em outros projetos de pesquisa a não ser que você autorize e que o Comitê de Ética em Pesquisa também o faça. Os resultados dos estudos que pretendemos realizar com as amostras de tecido, ou

qualquer informação sua jamais serão utilizados de forma a tratá-lo diferentemente ou discriminá-lo. Os resultados das análises não causarão em mudança no seu tratamento, nem tampouco sobre a vida de seus familiares, porque não buscam nenhum tipo de padrão de hereditariedade dessa doença.

Parte 4do Anexo 4

Esse projeto de pesquisa está sendo desenvolvido no contexto de um programa de pós-graduação (Doutorado) dessa Instituição em convênio com o Hospital A C Camargo da Fundação Antônio Prudente em São Paulo-SP-Brasil, portanto, algumas das técnicas de análise das amostras teciduais terão que ser realizadas em laboratório de Genômica Funcional na referida Instituição que conta com grande respaldo científico e tecnológico para tal, no entanto, esse processo será realizado e controlado somente pelo pesquisador responsável e logo que concluídas deverão ser mantidas no Instituto do Câncer do Ceará. Deve-se ressaltar que esse material pertence e sempre pertencerá a você e em hipótese alguma lhe será negado o direito de eventualmente resgatá-lo.

O Comitê de Ética Médica do Hospital do Câncer do Ceará - ICC é o responsável legal para a certificação de que os direitos dos pacientes estejam protegidos.

Os médicos responsáveis são: Dra. Adriana Pinheiro Bezerra Pires (31017093/986587555) e Dra. Rosane Oliveira de Sant'Ana (32884576/9984-5721) que você deverá contactar a qualquer momento em que enfrente qualquer problema relacionado ao estudo. Se você necessita de maiores informações a respeito do estudo antes de assinar o termo de consentimento, contacte os médicos acima.

DECLARAÇÃO DO MÉDICO OBTENDO CONSENTIMENTO PÓS- INFORMADO

Eu declaro que expliquei este protocolo de tratamento, com todos os detalhes necessários para o (a) paciente (ou seu responsável legal) _____. No meu julgamento, houve acesso a todas as informações disponíveis, incluindo os riscos e benefícios, para que se possa fazer uma decisão informada.

Assinatura do médico _____ Data ____/____/____

Nome do médico _____ CRM _____

DECLARAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

Eu declaro que li e compreendi a proposta de tratamento. Declaro também que discuti esta proposta pessoalmente com meu médico. Eu entendo os riscos da minha doença, o propósito do estudo, os métodos que serão utilizados e os riscos e benefícios do tratamento. Entendo também que a minha entrada neste estudo é voluntária.

Assinatura do (a) paciente _____ Data ____/____/____

Nome do (a) paciente _____ R. G. _____

Anexo 5 – Financiamento

1. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), projeto : Epidemiologia e genômica de adenocarcinomas gástricos no Brasil, processo: 14/26897-0, Pesquisados Responsável Prof Dr. Emmanuel Dias Neto , Insituição-sede A.C.Camargo Cancer Center.
2. Convênio da ECO com a Instituição UNICHRISTUS, compra de marcadores imunoistoquímicos, orçamento 3.000 reais.
3. Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico e Científico (FUNCAP), PPSUS-CE processo: :PP2-0089-00031. 01. 00/15, período de novembro de 2013 a novembro de 2015, orçamento: 86. 000 mil reais. O orçamento da equipe de pesquisa será necessário para dedicação e compromisso para realização das atividades propostas no protocolo. O material de consumo é justificado através dos métodos que foram utilizados nesta pesquisa. Neste projeto foi necessário o transporte de amostras do hospital para os laboratórios de pesquisa do A.C.Camargo câncer Center.
4. Os custos relativos a profissionais, cirurgia e quimioterapia são rotineiramente garantidos para pacientes com tal diagnóstico através de convênio do ICC ao Sistema Único de Saúde e do Hospital geral de Fortaleza, que é exclusivamente SUS. Os exames para diagnóstico, estadiamento e acompanhamento, além das drogas preconizadas na quimioterapia são rotineiramente utilizadas para câncer gástrico.

Anexo 6 - Avaliação da Regressão Tumoral

A resposta tumoral à terapêutica neoadjuvante foi assim avaliada:

- Grau 1 - ausência de tumor ou menos de 10% de células tumorais, resposta patológica completa - RPc;
- Grau 2 - entre 10 a 50% de células tumorais, remissão parcial – RP;
- Grau 3 - mais de 50% de células tumorais ou ausência de resposta – AR.

Pacientes Grau 1 e II foram classificados como respondedores (R+) e grau 3 não respondedores (R-).

Anexo 7 - Níveis de Evidência NCCN

- **Categoria 1:** a recomendação é baseada em evidência de alto nível (estudos randomizados controlados) e há uniformidade no consenso *NCCN*
- **Categoria 2A:** a recomendação é baseada em evidência de menor nível mas há uniformidade maior no consenso *NCCN*
- **Categoria 2B:** recomendação baseada em menor nível de evidência e com menor uniformidade no consenso *NCCN* (sem maiores discordâncias)
- **Categoria 3:** recomendação baseada em qualquer nível de evidência mas com grande nível de discordância entre os participantes do consenso *NCCN*.

Anexo 8 - Ficha Clínica

AVALIAÇÃO DO PERFIL MUTACIONAL, EXPRESSÃO GÊNICA E REGRESSÃO TUMORAL E DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EM PACIENTES COM CÂNCERES GÁSTRICOS LOCALMENTE AVANÇADOS SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA PERIOPERATÓRIA.

Paciente_____

Iniciais_____

TCLE___/___/___

Prontuário_____

1. Idade:

2. Sexo: (0) masculino (1) feminino

3. Data do diagnóstico de câncer gástrico:___/___/___

4. Tipo histológico: (0) carcinoma difuso (1) Carcinoma intestinal (2) misto
(3) adenocarcinoma SOE (4) carcinoma SOE

5. Avaliação pré- tratamento:

5. 1. Anamnese:

Perda de Peso: (0) não (1) sim, não especificado

() Kg em 6 meses

Sangramento digestivo: (0) não (1) sim

Disfagia: (0) não (1) sim

Dor: (0) não (1)sim – VAS_____

Vômitos (grau): (0) (1) (2) (3)

Procedimento para dieta:

(0) não (1) sim, qual_____data___/___/___

Dieta enteral (0) não (1) sim

. Outros:

Exame físico:

Geral: Peso___Kg

Altura___m

ECOG___

FR___rpm

FC___bpm

PA ___/___mmHg

BSA _____ m2

Pele:

Cabeça e pescoço:

Endócrino:

Hematológico:

Gastrointestinal:

Cardiovascular:

Respiratório:

Musculoesquelético:

Neurológico:

Psiquiátrico:

5. 2 Exames Complementares:

Laboratório (____/____/____):

Eritograma: Hb____ Ht____ He____

Leucograma ____/mm3

Diferencial: Eos____%

Bt____%

Seg____%

Linf____%

Mono____%

Contagem de plaquetas: ____/mm3

Uréia____ Creatinina____ TGO____TGP____

Bilirrubinas: T____ D____I____ FA____

Albumina____ TAP____CEA____ HCG____

Sódio____ Potássio____ Magnésio____ Cálcio____

Glicemia____

Sumário de urina____

EDA

(____/____/____):_____

Amostra para cDNA: (0) não (1) sim

Coleta sanguínea: (0) não (1) sim

6. TRATAMENTOS:

Quimioterapia neoadjuvante:

Drogas/doses:

(1) EOX (2) ECX (3) CX

CICLO 1

DATA: ____/____/____

Exame físico:

Peso ____ Kg Altura ____ m BSA ____ m²

ECOG ____ FC ____ bpm PA ____/____ mmHg

Temperatura ____

Pele:

Cabeça e pescoço:

Endócrino:

Hematológico:

Gastrointestinal:

Cardiovascular:

Respiratório:

Musculoesquelético:

Neurológico:

Psiquiátrico:

Medicações concomitantes:

Droga	Posologia	Duração	Razão

Exames laboratoriais (72hs antes do D1)

Hematimetria: Hb ____ Ht ____ He ____

Leucograma ____ /mm³

Diferencial: Eos ____ %

Bt ____ %

Seg ____ %

Linf ____ %

Mono ____ %

Contagem de plaquetas: ____ /mm³

Uréia ____ Creatinina ____ TGO ____ TGP ____

Bilirrubinas: T ____ D ____ I ____ FA ____

Realizado: (0) não (1) sim , razão:

Atrasado: (0) não (1) sim, razão:

Redução de dose (0) não (1) sim, razão:

Toxicidade:

Evento	SAE	Grau	data inicio	data fim	relação com a droga
	N (0) S (1)				N (0), sim (1)
	N (0) S (1)				N (0), sim (1)
	N (0) S (1)				N (0), sim (1)

Medicações concomitantes:

Droga	Posologia	Duração	Razão
-------	-----------	---------	-------

SEGUIMENTO

Visita de seguimento_____

Data: ____/____/____

Queixas:_____

Achados físicos:

Exames complementares:

Progressão (0) não (1) sim, data: ____/____/____

Status: (0) vivo (a) sem doença

(1) vivo (a) com doença

(2) morto (a) sem doença, data: ____/____/____

(3) morto (a) com doença, data: ____/____/____