EXPRESSÃO PROTEICA DE PD-L1 EM PACIENTES COM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO E DE TRANSIÇÃO ESÔFAGO-GÁSTRICA ANTES E APÓS TRATAMENTO NEOADJUVANTE E CORRELAÇÃO COM DESFECHOS CLÍNICOS

HÉBER SALVADOR DE CASTRO RIBEIRO

Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Maria Dirlei de Souza Begnami
Co-Orientador: Dr. Celso Abdon Lopes de Melo

São Paulo
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

R484 Ribeiro, Héber Salvador de Castro

Expressão proteica de PD-L1 em pacientes com adenocarcinoma gástrico antes e após tratamento neoadjuvante e correlação com desfechos clínicos / Héber Salvador de Castro Ribeiro - São Paulo; 2020.

75p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Maria Dirlei de Souza Begnami

Descritores: 1. Neoplasias Gástricas/Stomach Neoplasms. 2. Terapia Neoadjuvante/ Neoadjuvant Therapy. 3. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 4. Prognósticos/ Prognosis.

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

"Viver é muito perigoso... Porque aprender a viver é que é o viver mesmo... Travessia perigosa, mas é da vida. Sertão que se alteia e abaixa...O mais difícil não é um ser bom e proceder honesto, dificultoso mesmo, é um saber definido o que quer, e ter o poder de ir até o rabo da palavra."

Guimarães Rosa

DEDICATÓRIA

À **Deus**, Presença constante em minha vida.

À **Janaina** pelo apoio pleno e diário e o amor insistente e indispensável que me trouxe até aqui.

Ao fantástico **João Salvador**, cuja chegada ressignificou tudo o que eu julgava importante e indispensável. Que ao longo de sua vida, meu filho, minhas atitudes, escolhas e realizações pessoais e profissionais possam lhe servir como um exemplo amoroso e estímulo de como trabalho e dedicação são as melhores vias para você conseguir o que almejar.

Aos meus pais, **José e Élia, e aos meus irmãos, sobrinhos e "agregados"**: olhar de onde vim e quem caminhou comigo até aqui é a melhor métrica para entender e aquilatar conquistas e felicidades.

À família que construí em São Paulo – **nossa confraria** – podemos passar meses sem nos ver e quando nos encontramos, parece que foi ontem. Mas o melhor mesmo é não deixar passar o tempo amigos!

Aos **pacientes** aqui arrolados e a tantos outros que tratamos sem nunca enxergar apenas números, mas sim histórias, experiências e perspectivas. Lembrei-me perfeitamente de vários rostos enquanto atualizava o levantamento, de detalhes felizes e outros nem tanto. Alegrei-me com boas notícias e me enlutei com desfechos desfavoráveis. Que a informação aqui contida seja mais uma forma de podermos contribuir para o tratamento eficaz desta doença, beneficiando ainda mais pessoas.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Dirlei de Souza Begnami por acreditar que seria possível, mesmo quando pareceu não ser. Sua trajetória profissional e como pesquisadora me inspira a seguir acomodando a prática da assistência, o ensino e a pesquisa no meu quotidiano, e seu padrão de excelência é quilate fidedigno de que estes três preceitos podem ser executados em altíssimo nível.

Ao Dr. Celso Abdon Lopes de Melo pela orientação firme e construtiva, não só na tese mas desde minha formação como residente, mostrando que embasamento teórico é fundamental para a assistência qualificada, mesmo que, às vezes, "quando acabe a medicina, comece a arte".

Ao Dr. Wilson Luiz da Costa Junior, amigo e companheiro de departamento, pela contribuição inestimável e perene, que nem milhares de quilômetros abalou. Seu exemplo de como perseguir um objetivo de vida é algo que quero transmitir ao João, além, é claro, dos seus conceitos de retidão e coerência.

Aos Drs. Felipe José Fernández Coimbra, Alessandro Landskron Diniz, André Luís de Godoy, Igor Correia de Farias e Silvio Melo Torres pelo companheirismo e apoio na prática clínica diária e por tratarem tão bem de seus pacientes. O resultado desta tese expressa, antes de tudo, a excelência de seu trabalho e sua dedicação incontestável ao melhor desfecho, sempre.

Aos colegas de trabalho do Centro de Referência de Tumores do Trato Digestivo Alto do A.C.Camargo Cancer Center, incluindo os Drs. Maria Fernanda, Paula Nicole, Chiang Tyng (*in memorian*), Rachel Riechelmann, Victor Hugo, Tiago Felismino, Virgílio Souza, Newton Augusto, Milton Barros, Mauro Donadio, Aldo Detino, Helano Freitas, Charles Zurstrassen, Marcelo Cavicchioli, Ricardo Fogarolli, Aline Cavalcante, João Paulo Matushita, Adriane Pelosof, Claudia Zitron, Laura Carolina e outros, porque estes resultados também são seus.

À Dra. Tatiane Neotti, pioneira e audaciosa na aventura de me tornar um patologista por algumas horas. Muito obrigado pelo seu desprendimento.

À Dra. Vilma Martins, à Superintendência de Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center e ao Centro Internacional de Pesquisas (CIPE), na pessoa do Dr. Emmanuel Dias-Neto, pelo decisivo suporte logístico e financeiro ao projeto.

Aos Drs. Antônio Nascimento e Laura Carolina e ao Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center pelo apoio inconteste.

Às enfermeiras Narimã Marques e Gisele Polotow pela inestimável contribuição na coleta de dados e resgate de lâminas e blocos sem o que não seria possível prosseguir com as análises aqui apresentadas.

À Suely Francisco, pela ajuda na formatação deste documento que agora vocês leem. Você faz parecer fácil e simples o que me tirou do sério várias vezes nesta jornada.

RESUMO

Ribeiro HSC. **Expressão proteica de PD-L1 em pacientes com adenocarcinoma gástrico e de transição esôfago-gástrica antes e após tratamento neoadjuvante e correlação com desfechos clínicos**. [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

Introdução: A incidência e o impacto preditivo e prognóstico da expressão proteica de PD-L1 em pacientes com câncer gástrico submetidos a tratamento perioperatório é incerto, bem como a influência do tratamento sistêmico nesta expressão. **Objetivo:** Determinar a expressão de PD-L1 em biópsias de neoplasias gástricas pré-neoadjuvância e em peças cirúrgicas após este tratamento e correlacionar estes achados com a resposta à quimioterapia pré-operatória e com os resultados de sobrevida observados. **Método:** Coorte retrospectiva de pacientes com câncer gástrico e de TEG tratados no A.C.Camargo Cancer Center de 2007 a 2017. Biópsias pré tratamento e de áreas representativas da neoplasia colhidas das peças cirúrgicas após a neoadjuvância e representadas em TMA foram analisadas por IHQ utilizando-se o anticorpo 22C3 PharmDx da DAKO com os resultados analisados pelo CPS. A SG e SLD foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e a regressão de Cox foi usada para calcular os HR crus e ajustados para fatores prognósticos. **Resultado:** Duzentos e setenta pacientes foram incluídos, com mediana de idade de 58,9 anos, 51,5% estadiados como cT3-T4N+, 45% com histologia difusa. Após a pós-neoadjuvância, 13% de casos apresentaram resposta completa e 53% com regressão tumoral inferior a 50%. Com um seguimento mediano de 60,3 meses, as sobrevidas global e livre de doença medianas não foram atingidas. O percentual de casos PD-L1 positivos nas biópsias foi 11,4% e em peças cirúrgicas foi 18,6% com CPS mediano de 3 (IQR 2,0 – 7,5) e 9 (IQR 5,0 – 20,0) respectivamente. Em 18,9% dos casos com amostras pareadas, as mesmas foram classificadas como PD-L1 negativo nas biópsias e positivos na peça cirúrgica. A expressão proteica do PD-L1 não esteve associada nem à resposta patológica nem aos resultados de sobrevida. **Conclusão:** A expressão proteica de PD-L1 em pacientes com câncer gástrico e de TEG submetidos à quimioterapia perioperatória é baixa e significativamente diferente quando analisada nas biópsias pré-tratamento e nas peças cirúrgicas e, nessa coorte, não se correlacionou com sobrevida.

Descritores: Neoplasias Gástricas. Terapia Neoadjuvante. Prognósticos. Imuno-Histoquímica

ABSTRACT

Ribeiro HSC. **[Immunohistochemical expression of PD-L1 before and after neoadjuvant therapy in gastric and GEJ cancer patients and its association with clinical features and outcomes]**. [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

Background. The incidence, prognostic and predictive impacts of PD-L1 IHC expression in locally advanced gastric cancer is uncertain as well as the effect of preoperative treatment on this expression. We aimed to determine the expression of PD-L1 by CPS in the pre-treatment biopsy and surgical specimens of patients with gastric cancer who received neoadjuvant therapy and its association with pathological response and survival outcomes. **Method**. Retrospective cohort of patients treated at a cancer center from 2007 to 2017. Patients with confirmed gastric or GEJ adenocarcinoma who received neoadjuvant treatment and curative-intent surgery were included. Gastric stump tumors and those who had a total esophagectomy were excluded. Clinical data were obtained from medical charts. Biopsy samples and a tissue microarray with the most representative areas of the surgical specimen were used to evaluate PD-L1 IHC expression with 22C3 phamDx antibody. Results were analyzed using the CPS score. Overall and DFS survival included the Kaplan-Meier product-limit estimator and a Cox regression was used to obtain crude and adjusted HR for prognostic factors. **Results.** 270 patients were included: median age was 58.9 years, most (51.5%) had cT3-T4N+ stages, 45% had diffuse histology and 87.8% completed the preoperative regimen. 13% had a pCR, while 53% had minimal tumor regression. With a median follow-up of 60.3 months (CI 95% 54.7 – 65.8), the median OS and DFS were not reached. 11.4% of biopsies and 18.6% of surgical specimens had positive CPS, with a median score of 3 (IQR 2,0 – 7,5) and 9 (IQR 5.0 – 20.0) respectively. In 18.9% of paired samples the PD-L1 expression was found to be negative in the biopsy sample and positive in the surgical specimen. PD-L1 expression was neither associated with pathologic response after neoadjuvant chemotherapy, nor with survival outcomes. **Conclusion**. PD-L1 expression on the setting of locally advanced gastric cancer was low and it was different when biopsy and surgical specimens were compared. No impact on survival results could be detected.

Keywords: Stomach Neoplasms. Neoadjuvant Therapy. Prognosis. Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Visão esquemática das vias de evasão do sistema imune e de ação dos inibidores de Checkpoint 6

Figura 2 Confecção do TMA e análise do PD-L1 em biópsias e peças cirúrgicas 23

Figura 3 Seleção da população de estudo e disponibilidade de blocos de parafina para análise imuno-histoquimica 26

Figura 4 Curva de sobrevida global de 270 pacientes com câncer gástrico tratados entre 2007 e 2017 32

Figura 5 Curva de sobrevida livre de doença de 270 pacientes com câncer gástrico tratados entre 2007 e 2017 32

Figura 6 Sobrevida global dos pacientes segundo a resposta patológica tumoral categorizada pelo percentual de células tumorais viáveis (p<0,001) 33

Figura 7 Sobrevida livre de doença segundo a resposta patológica categorizada pelo percentual de células tumorais viáveis (p<0,001) 34

Figura 8 Exemplo de caso discordante quanto à expressão do PD-L1 36

Figura 9 Exemplo de heterogeneidade da expressão do PD-L1 em peça cirúrgica pós neoadjuvância 37

Figura 10 Curva de Sobrevida Global segundo a expressão imuno-histoquimica de PD-L1 40

Figura 11 Curva de Sobrevida Livre de Doença segundo a expressão imuno-histoquimica de PD-L1 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Caracterização da amostra de pacientes quanto às variáveis clinicas e do tumor primário 27

Tabela 2 Caracterização do tratamento sistêmico perioperatório instituído e toxicidade 29

Tabela 3 Caracterização do tratamento cirúrgico e da morbimortalidade pós-operatória..... 30

Tabela 4 Resultados das análises patológicas nas peças cirúrgicas pós tratamento neoadjuvante. 31

Tabela 5 Expressão de PD-L1 nas amostras tumorais pré e pós neoadjuvância e por casos totais e pareados 35

Tabela 6 Fatores prognósticos associados à expressão do PD-L1 em 155 casos de câncer gástrico submetidos a tratamento neoadjuvante 39

Tabela 7 Análise uni e multivariada de fatores prognósticos de sobrevida global ... 42

Tabela 8 Análise uni e multivariada de fatores prognósticos de sobrevida livre de doença 43

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	*American Joint Committee on Cancer*
AKT	*Protein Kinase B*
ASA	*American Society of Anesthesiologists*
CDH1	Gene da E-Caderina
CF	Cisplatina + Fluorouracil
CIMP	*CpG Island Methylator Phenotype*
CIN	*Cromossomal Instability*
CPS	*Combined Positive Score*
CTLA-4	*Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*
DCF	Docetaxel + Cisplatina + Fluorouracil
DFS	*Disease Free Survival*
EBV +	Câncer gástrico associado ao *Epstein-Barr Virus*
ECF	Epirrubicina + Cisplatina + Fluorouracil
ECX	Epirrubicina + Cisplatina + Xeloda
ERK2	*Extracellular signal-regulated kinase 2*
EOX	Epirrubicina + Oxaliplatina + Xeloda
FDA	*Food and Drug Administration*
FLOT	Fluorouracil + Leucovorin + Oxaliplatina + Taxano (Docetaxel)
FLOX	Fluorouracil + Leucovorin + Oxalipatina
FOLFOX	Fluorouracil + Leucovorin + Oxalipatina
GEJ	*Gastroesophageal Junction*
HER2	*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*
HR	*Hazard Ratio*
IARC	*International Agency for Research on Cancer*
IC95%	Intervalo de 95% de confiança
IDO	*indoleamine 2,3-dioxygenase*
IHC	*Immunohistochemistry*
IHQ	*Imuno-histoquimica*
IMC	Índice de Massa Corpórea
INCA	Instituto Nacional do Câncer

IQR	*Interquartile Range*
JAK2	*Janus kinase 2*
LAG-3	*Linfocyte Activation Gene 3*
MLH1	*Human MutL homolog 1 gene*
MSI	*Microsatellite Instability*
MSS	*Microsatellite Stability*
mTOR	*Mammalian Target of Rapamycin*
OS	*Overall Survival*
pCR	*pathological Complete Response*
PD1	*Programmed Cell Death Protein 1*
PD-L1	*Programmed Death-Ligand 1*
PD-L2	*Programmed Death-Ligand 2*
PIK3CA	*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*
PTEN	*Phosphatase and tensin homolog*
RHOA	*ras homolog gene Family, member A*
SG	*Sobrevida Global*
SDL	*Sobrevida Livre de Doença*
TCGA	*The Cancer Genome Atlas Research Network*
TEG	Transição Esofago-Gástrica
TILs	*Tumor-Infiltrating Lymphocytes*
TMA	*Tissue Microarray*
TMB	*Tumor Mutational Burden*
TPS	*Tumor Proportinal Score*
TP53	*Tumor Protein p53*
Tregs	*Regulatory T cells*
TRG	*Tumor Regression Grade*
VISTA	*V-Domain IG Supressor of T-cell Activation*
WHO	*World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Carcinogênese e classificação patológica 1
1.2 Classificação molecular e mecanismos de evasão imune 3
1.3 Padronização do tratamento locorregional do câncer gástrico 6
1.4 Tratamento multimodal do adenocarcinoma gástrico e perspectivas futuras ... 8
1.5 Resposta patológica e sobrevida 11
1.6 Seleção de pacientes para as melhores estratégias: um desafio emergente 12

2 JUSTIFICATIVA 16

3 OBJETIVOS 17
3.1 Objetivo Principal 17
3.2 Objetivos Secundários 17

4 PACIENTES E MÉTODOS 18
4.1 Tipo de Estudo 18
4.2 Pacientes 18
4.3 Variáveis 19
4.4 Avaliação anatomo-patológica e da expressão proteica do PD-L1 20
4.5 Desfechos avaliados 23
4.6 Análise estatística 24
4.7 Considerações éticas e consentimento pós-Informado 24

5 RESULTADOS 25
5.1 Caracterização da população de estudo 25
5.2 Resultados de sobrevida 31
5.3 Expressão imuno-histoquímica do PD-L1 34
5.4 Fatores prognósticos de sobrevida 41

6 DISCUSSÃO 44
6.1 Análise dos resultados gerais 44
6.2 Resposta patológica e sobrevida 46
6.3 A expressão proteica de PD-L1 e a heterogeneidade intra-tumoral 48

6.4 Fatores clinico-patológicos associados à expressão do PD-L1 54
6.5 Fatores prognósticos de sobrevida – (ausência de) o impacto da expressão do PD-l1 nos desfechos clinicos 57

7 LIMITAÇÕES E IMPACTO NA PRÁTICA CLÍNICA 62

8 CONCLUSÃO 63

9 REFERÊNCIAS 64

ANEXOS

Anexo 1 Classificação de Complicações Pós-Operatórias de Clavien-Dindo

Anexo 2 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

1 INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma gástrico configura uma importante causa de morbi-mortalidade por neoplasias em todo o mundo. Segundo os dados do GLOBOCAN, publicados em 2018, neste ano, devem ter ocorrido cerca de 1.033.000 casos desta doença, com mais de 780 mil óbitos, números que o tornam o quinto tumor mais frequentemente diagnosticado e a terceira causa de óbito por câncer em todo o mundo (Bray et al. 2018; Ferlay et al. 2019). No Brasil, a projeção do INCA estima cerca de 21.000 novos casos de câncer gástrico em 2020, correspondendo ao quarto tumor mais incidente em homens e o sexto entre as mulheres (Ministério da Saúde 2020).

Entre os fatores de risco, se destaca a infecção pelo H. pylori, sendo que cerca de 75 a 90% dos casos podem ser atribuídos a esta causa (Plummer et al. 2015). Além disto, um componente dietético parece ser também preponderante, incluindo o alto consumo de sal (especialmente em alimentos conservados salgados), além de dieta pobre em frutas, o tabagismo e o consumo excessivo de álcool (IARC-Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 2012). É importante destacar que a maioria dos casos parece estar relacionada a uma sinergia destes fatores de risco mais do que a apenas uma causa. Fatores genéticos respondem por uma menor parcela de casos, com menos de 10% deles estando associados a síndromes de câncer hereditário tais como a síndrome do câncer gástrico difuso hereditário e a síndrome de Li-Fraumeni (Mclean et al. 2014).

A incidência do câncer gástrico é variável em diferentes áreas do mundo, provavelmente relacionada à prevalência destes fatores de risco e a fatores genéticos. Esta mesma relação parece explicar o declínio da incidência de tumores distais e um aumento no número de casos de tumores proximais, mais relacionados a fatores como obesidade e doença do refluxo gastro-esofágico (Demartel e Parsonnet 2018).

1.1 CARCINOGÊNESE E CLASSIFICAÇÃO PATOLÓGICA

O adenocarcinoma gástrico é uma neoplasia complexa e heterogênea. Fatores como a idade de acometimento, a localização tumoral, os achados histológicos e moleculares, bem como a correlação etiológica de características genéticas e associadas ao meio ambiente variam enormemente entre os indivíduos acometidos. A herança familiar, conforme citado anteriormente, parece corresponder a cerca de 10% dos casos, dentre os quais 3% podem ser

atribuídos a mutações germinativas específicas (como por exemplo o gene da E-caderina, CDH1) (Vogelaar et al. 2012). Nos demais 90% de casos considerados esporádicos, a infecção pelo *Helicobacter pylori* é um dos eventos etiológicos predominantes, com a colonização do epitélio gástrico levando a uma série de eventos inflamatórios pré-cancerosos, incluindo a gastrite crônica, a atrofia da mucosa, a metaplasia intestinal e à sequência displasia – adenocarcinoma (Tan e Yeoh 2015). A co-infecção com outros patógenos como o vírus do *Epstein-Barr* parece exercer um papel importante em um subgrupo de pacientes enquanto a ocorrência da neoplasia em pacientes *H. pylori* negativos é rara (0.42 a 24.6% dos casos), e dependente de critérios diagnósticos e geográficos (Yamamoto et al. 2015). Cirurgias gástricas prévias e a exposição constante ao refluxo alcalino são também fatores de risco reconhecidos na origem desta neoplasia.

Do ponto de vista patológico, o adenocarcinoma gástrico pode ser categorizado em diferentes subtipos e as classificações mais conhecidas são a de Laurén e a da *World Health Organization-WHO* (Organização Mundial da Saúde-OMS).

A classificação de Laurén, inicialmente descrita em 1965, é ainda amplamente utilizada e separa estes tumores em tipos intestinais, difusos e mistos / indeterminados. O subtipo intestinal parece ser o mais frequente (54%) e está associado a idade mais avançada, tumores distais (não-cárdia), sexo masculino e presença de metaplasia intestinal. Por outro lado, os tumores difusos são menos frequentes (32%), incidem em indivíduos mais jovens, mais comumente em topografia mais proximal do órgão e carregam um prognóstico mais reservado (Laurén 1965). Embora a infecção pelo *H. pylori* seja prevalente em ambos os subtipos, ela parece exercer um papel mais preponderante na carcinogênese do subtipo intestinal.

Por outro lado, a classificação da WHO de 2019 reconhece cinco subtipos principais de adenocarcinoma gástrico, quais sejam tubular, papilífero, mucinoso, de células pouco coesas (incluindo os casos com células em anel de sinete e outros subtipos) e os adenocarcinomas mistos, além de subtipos mais raros. A classificação é baseada no subtipo predominante, uma vez que frequentemente mais de um perfil histológico pode ser encontrado no mesmo paciente (Nagtegaal et al. 2020).

Apesar de muito úteis na categorização de pacientes e, inclusive, na seleção dos mesmos para diferentes modalidades de tratamentos loco-regionais (endoscópicos e cirúrgicos), tanto a classificação de Laurén quanto a da WHO têm sido de pouca valia na estruturação de estratégias de tratamento alvo-específicas da doença, uma vez que as principais vias moleculares e os potenciais alvos terapêuticos não são referidos em ambas. Até há pouco tempo, a única característica molecular do adenocarcinoma gástrico traduzida em estratégia de tratamento na

prática clínica era a descoberta de que tumores que hiper-expressam a proteína HER2 (7-34% dos casos) apresentam ganho de sobrevida no cenário metastático com a adição do Trastuzumab, um anticorpo que bloqueia a autodimerização desta molécula e a ativação constitutiva desta via de sinalização, ao tratamento baseado em platina e fluoropirimidina (Bang et al. 2010). Isto reforça a necessidade de classificações que levem em consideração o conhecimento mais aprofundado dos mecanismos de carcinogênese do adenocarcinoma gástrico bem como os potenciais alvos terapêuticos identificáveis como estratégias de melhorar o enfrentamento desta doença.

1.2 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR E MECANISMOS DE EVASÃO IMUNE

Na última década, observou-se um grande esforço de vários grupos internacionais em evoluir destas classificações anatomo-patológicas da doença para uma compreensão mais ampla dos mecanismos moleculares, incluindo a mudança na estratégia de análise de mutações genéticas específicas e pontuais para o sequenciamento genômico completo, além da consideração de fenômenos epigenéticos nesta caracterização.

Neste sentido, em 2014, o *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) produziu a classificação molecular do adenocarcinoma gástrico até o momento mais divulgada e discutida na literatura especializada. Nesta classificação, as neoplasias gástricas foram separadas em quatro grupos, incluindo o subtipo *Epstein-Barr* virus positivo (EBV+), o grupo com instabilidade de microssatelites (MSI), o subtipo com instabilidade cromossômica (CIN) e os tumores com estabilidade genômica (Cancer Genome Atlas Research Network 2014).

Os tumores EBV+ correspondem a cerca de 8-10% dos casos (Cancer Genome Atlas Research Network 2014; Pereira et al. 2018) e estão associados a uma alta frequência de mutações de *PIK3CA*, hipermetilação do DNA (CpG Island Methylator Phenotype - CIMP) e amplificação de *JAK2, PD-L1* e *PD-L2*. São mais incidentes em pacientes do sexo masculino, jovens e sem predileção por subtipo patológico. Já o subgrupo com instabilidade de microssatélites corresponde a cerca de 22-30% dos casos e se caracteriza pela hipermetilação de *MLH1*, constituindo um conjunto de tumores com alta carga mutacional e um perfil de metilação do DNA chamado Gastric-CIMP. Há, neste caso, a predileção por pacientes do sexo feminino, mais idosas, tumores do tipo intestinal de Laurén e surgidos nas porções mais distais do órgão. O subtipo de estabilidade genética responde por mais um quinto dos casos e está associado à histologia difusa, a mutações de *RAS* e de *RHOA* e de proteínas de adesão celular incluindo a e-caderina (*CDH1*). E finalmente o grupo de instabilidade cromossômica (CIN)

consiste no maior número dos casos (50%) e prepondera entre tumores intestinais, com amplificação de receptores tirosina-kinase, mutação de *TP53* e aneuploidia.

É importante salientar que paralelamente a este trabalho, outros grupos utilizaram características moleculares, de expressão gênica e de mecanismos epigenéticos semelhantes para produzir outras classificações, como por exemplo a do *Asian Cancer Research Group*. Todas, no entanto, embora sinalizem mais claramente a respeito de uma categorização com maior repercussão clinica dos diversos subtipos moleculares do câncer gástrico, ainda carecem de validações globais e de demonstrarem-se capazes de predizer prognóstico e resposta às abordagens terapêuticas multidisciplinares vigentes (Cristescu et al. 2015).

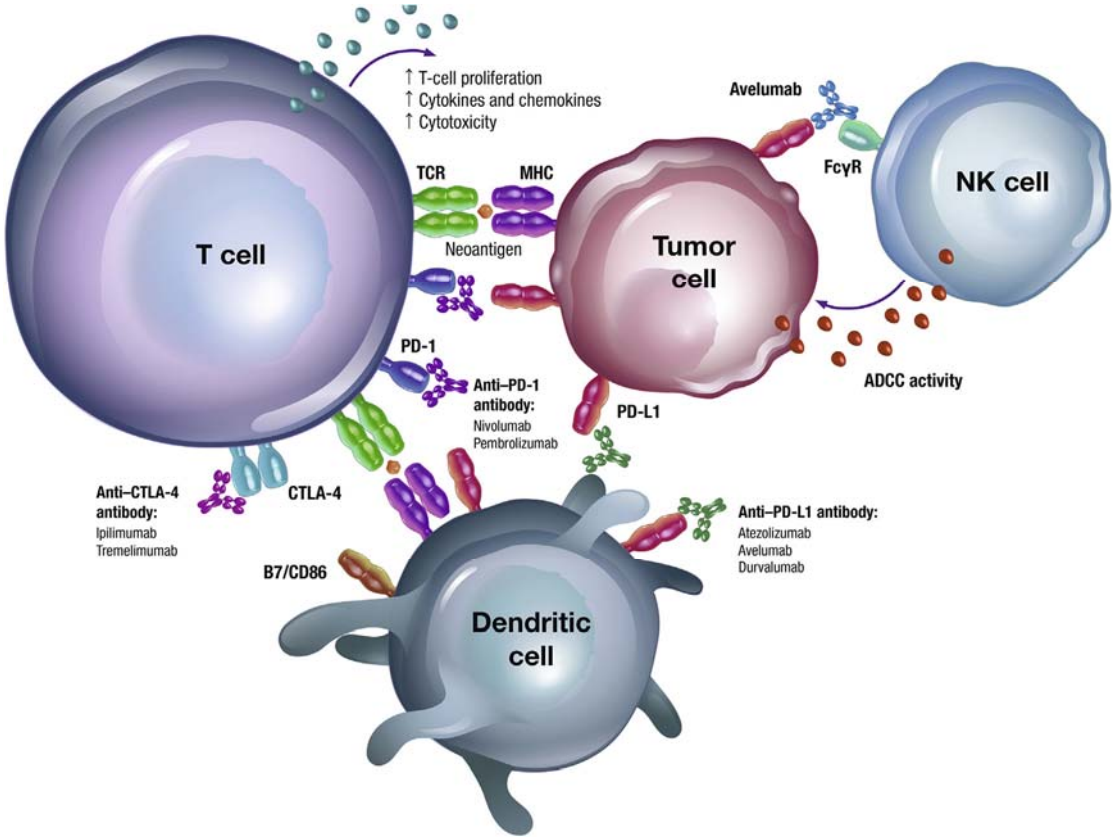
Este entendimento, associado às recentes descobertas sobre os mecanismos de evasão à resposta imune das neoplasias sólidas lançou luz à uma nova frente terapêutica para pacientes com câncer gástrico. Simultaneamente ao lançamento da classificação molecular do TCGA, algumas análises mostraram uma alta incidência de expressão de proteínas associadas aos *checkpoint* imunes nestes pacientes, especialmente aqueles com os subtipos EBV+ e MSI. Neste mesmo sentido, a imunossupressão para transplantados ou portadores de doenças autoimunes esteve correlacionada com o surgimento de casos de câncer gástrico, reforçando o *link* entre a ação dos mecanismos de defesa imunológica e o aparecimento e a progressão da doença (Yang et al. 2016).

Além disso, proteínas chaves na modulação do sistema imune tais como CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), IDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*), LAG-3 (*Linfocyte Activation Gene 3*) e PD-1 (*Programmed cell death 1*) estão super-expressas em células imunes de pacientes com câncer gástrico sugerindo um papel da exaustão da capacidade de defesa das células T induzida pelo tumor na progressão da doença (Kim JW et al. 2016).

De modo sucinto, a ativação de células T e a tolerância imune são parcialmente mediadas pela família de proteínas B7. Destas, PD-1 é reconhecidamente expressa por linfócitos T ativados nos centros germinativos de folículos linfoides e também em linfócitos infiltrados em tumores (TILs – *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*) e em outras células imunes. Por outro lado, B7-H1, uma proteína trans-membrana mais conhecida como *Programmed death ligant 1* (PD-L1), expressa pelas células tumorais e por células do sistema imune, é responsável pela regulação negativa da resposta imune mediada pela célula T ao se ligar ao seu receptor na superfície destas células (PD-1). A hiper-expressão de PD-L1 pelas células tumorais está associada à apoptose de linfócitos T reativos ao tumor e à progressão tumoral (Dong et al. 2002). Esta correlação entre a expressão destas proteínas de *checkpoint* imunes com a tumorigênese gástrica é ainda reforçada pelo fato de que a expressão de PD-L1 é ausente em

tecido gástrico normal e é apenas fraca em adenomas gástricos. Por outro lado, 30 – 65% dos casos de adenocarcinoma gástrico invasivos expressam PD-L1 e esta expressão está correlacionada com profundidade de invasão, acometimento linfonodal, disseminação sistêmica e tamanho do tumor (Lin et al. 2018).

O impacto da hiper-expressão destas proteínas de bloqueio da resposta imune nos resultados de sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma gástrico é ainda contraditório na literatura, com coortes apontando para um pior prognóstico (Qing et al. 2015; Dai et al. 2017), provavelmente relacionado à capacidade tumoral de evasão do sistema imune que tal expressão sinaliza, enquanto outras sinalizaram em sentido contrário (Kim JW et al. 2016; Böger et al. 2016). O que de fato fica claro é que o entendimento do mecanismo pelo qual a neoplasia faz uso deste eixo PD1/PD-L1 silenciando o reconhecimento e o ataque imune à suas células, bem como outros mecanismos de evasão destas defesas, abriu recentemente um novo flanco de tratamento desta doença, pelo uso de anticorpos capazes de bloquear estas proteínas e religar a capacidade reativa do sistema imune como veremos a seguir (Figura 1). Selecionar os casos com maior potencial de benefício de seu emprego passa então a ser o desafio que se impõe.



Fonte: Taieb et al. (2018)

Figura 1 - Visão Esquemática das vias de evasão do sistema imune e de ação dos inibidores de Checkpoint. Dentre estas proteínas, PD-1 e CTLA-4 são expressas na superfície das células T enquanto PD-L1 é expressa na célula tumoral e nas células imunes e interagem com seus ligantes em células apresentadoras de antígenos (como as células dendríticas) resultando em evasão aos mecanismos de defesa imune. Inibidores de Checkpoint restauram este reconhecimento impedindo a interação destas proteínas no microambiente tumoral.

1.3 PADRONIZAÇÃO DO TRATAMENTO LOCORREGIONAL DO CÂNCER GÁSTRICO

O tratamento curativo do câncer gástrico se assenta, até onde a vista alcança, na realização de algum procedimento de remoção da lesão neoplásica com margens de segurança, seu correto estadiamento anatomo-patológico e na adição de tratamento sistêmico nos casos de doença não localizada ou de maior risco para recorrência. Ambas as estratégias – tratamento local e sistêmico – têm sido continuamente atualizadas e apresentado recentemente, em centros de referência, sucessivas melhorias nos resultados produzidos. Dados de ressecções endoscópicas cada mais seguras e tecnicamente adequadas, de procedimentos cirúrgicos ora minimamente invasivos e de rápida recuperação pós-operatória, ora ampliados e cada vez mais seguros do ponto de vista técnico e de avanços no tratamento sistêmico com estratégias de

quimioterapia perioperatória, com ou sem o uso de terapias alvo e, mais recentemente, com o emprego da imunoterapia, explicam taxas crescentes de sobrevida alcançadas em vários cenários da doença. Apesar disto, muito ainda há que ser feito no cenário da doença metastática ou recorrente.

Especificamente sobre a padronização do tratamento local, seguimos, em nossa instituição, os princípios recomendados pela *Japanese Gastric Cancer Association* (2020), conforme estabelecido em nosso manual institucional (Costa et al. 2013) e em publicações nacionais (Zilberstein et al. 2013). Lesões consideradas precoces, com infiltração de mucosa ou submucosa sem disseminação linfonodal podem ser tratadas endoscopicamente ou por uma ressecção cirúrgica mais limitada. Assim, tumores bem diferenciados, restritos à mucosa, menores que dois centímetros e sem ulceração são os candidatos ideais à mucosectomia endoscópica. Lesões que excedam este critério de diâmetro (até 3 cm) e em centros com equipe de endoscopia altamente especializadas podem ser tratados com um procedimento de dissecção de submucosa (ESD). Quando a ressecção endoscópica não é factível nestes critérios tais pacientes devem ser submetidos a uma gastrectomia com margens proximais de ressecção de dois centímetros, associados a uma linfadenectomia limitada, dita D1 na classificação Japonesa. Este procedimento inclui a remoção dos linfonodos das cadeias peri-gástricas e da artéria gástrica esquerda que deve ser ligada na sua origem. Em casos de lesões que infiltrem a submucosa, sem evidência de comprometimento linfonodal ou em tumores com critérios mencionados anteriormente, mas de subtipo difuso, esta linfadenectomia deve ser estendida a um nível intermediário, a chamada D1+, acrescentando a remoção dos gânglios ao longo da artéria hepática comum e do tronco celíaco nas gastrectomias subtotais e da artéria esplênica proximal em caso de gastrectomias totais.

Os tumores que no estadiamento pre-operatório demonstrem infiltração da camada muscular do estômago ou além e aqueles com evidencia de comprometimento linfonodal devem ser submetidos a uma gastrectomia com linfadenectomia a D2, termo que cunha a remoção de, além das estações linfonodais incluídas na linfadenectomia D1+, os gânglios do ligamento hepato-duodenal e do território proximal da artéria esplênica para as gastrectomias subtotais e distais a este vaso e do hilo esplênico para as gastrectomias totais (Japanese Gastric Cancer Association 2011). As margens proximais de ressecção necessárias devem ser mais amplas que nos procedimentos para tumores mais inicias, atingindo três centímetros para lesões T2 e cinco centímetros para lesões mais profundas.

Esta padronização cirúrgica parece ser reprodutível para tumores iniciais e com a mesma segurança oncológica já estabelecida pela cirurgia laparotômica utilizando-se a via de

acesso minimamente invasiva, laparoscópica ou robótica, com o benefício adicional de redução do tempo de internação, da dor e abreviação da recuperação pós-operatória (Kim W et al. 2016; Hu et al. 2016). Para pacientes com doença mais avançada, incluindo infiltração de serosa e linfonodomegalias extensas em exames de estadiamento são ainda aguardados dados de segurança oncológica e comparação de resultados de sobrevida (Hur et al. 2015), o que nos faz, em nosso serviço, manter a via de acesso laparotômica para estes casos.

Os resultados de sobrevida com cirurgia exclusiva para pacientes submetidos a estes procedimentos padronizados são comparáveis entre serviços orientais e ocidentais, incluindo taxas de sobrevivência em cinco anos em torno de 90% no estádio clínico I, 70% no estádio II, 45% no estádio III e entre 5% e 10% no estádio IV (Lee et al. 2001), segundo estadiamento do *Tumor Node Metastasis*-TNM da *American Joint Committee on Cancer*-AJCC (Amin et al. 2018). Séries de dados populacionais americanos, no entanto, apontam para resultados muito inferiores a estes, incluindo sobrevida em cinco anos para casos tidos como localizados de 60,9% e de apenas 25,2% para aqueles classificados como com disseminação regional (N+) (Jim et al. 2017). Além disto, taxas de recorrência de até 30 – 60% são descritas após tratamento cirúrgico aparentemente curativo, com acréscimo significativo deste risco com o aumento da profundidade de invasão na parede do órgão e com o acometimento linfonodal. A não aderência à padronização do tratamento cirúrgico radical e o alto percentual de pacientes diagnosticados com doença localmente avançada fortaleceu, nas últimas décadas, a busca por estratégias de tratamento multimodal, agregando radio e quimioterapia à ressecção cirúrgica, como discutimos a seguir.

1.4 TRATAMENTO MULTIMODAL DO ADENOCARCINOMA GÁSTRICO E PERSPECTIVAS FUTURAS

A percentagem de pacientes diagnosticados com tumores em estadios clínicos mais avançados varia em todo o mundo e está correlacionada a estratégias de rastreio populacional, presentes em países de alta incidência da doença. No Brasil, por exemplo, recente documento do Tribunal de Contas da União sugere que 38% dos casos de câncer gástrico são diagnosticados no estadio III e outros 41% no estadio IV (Brasil 2019). Nos Estados Unidos, menos de um terço dos casos são diagnosticados em estadios iniciais, o que resulta em uma taxa de sobrevivência global de 30% em cinco anos considerando-se todos os estadios agrupados (National Cancer Institute-NCI 2018).

A primeira estratégia estudada a demonstrar benefício em taxas de controle da doença com o tratamento multimodal foi a adjuvância, utilizando-se radio e quimioterapia em estudos americanos e apenas quimioterapia em estudos orientais. Assim, em 2001 foi publicado o resultado do INTERGROUP 0116 no qual pacientes com cirurgias tecnicamente inadequadas apresentaram ganho de sobrevida com a realização de radio e quimioterapia adjuvantes (Macdonald et al. 2001). Em outra direção, com pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico padronizado e com controle restrito de adequação e aderência ao protocolo de linfadenectomia preconizado, estudos orientais evidenciaram benefício da adição de quimioterapia à gastrectomia, tanto em sobrevida livre de progressão quanto em sobrevida global, incluindo esquemas baseados em S1 (pró-droga metabolizada em Fluorouracil) (Sakuramoto et al. 2007) e na combinação de Capecitabina com oxaliplatina (XELOX) (Bang et al. 2012). Uma crítica contínua apresentada à esta estratégia, especialmente nos estudos que tentaram repeti-la em pacientes ocidentais, foi sempre a alta taxa de descontinuidade do tratamento por toxicidade limitante ou decisão do paciente, especialmente os mais idosos e/ou submetidos à gastrectomia total. Em ambos os estudos menos de 70% dos pacientes completaram os protocolos de tratamento propostos, o que leva a crer que estratégias que garantissem uma maior taxa de completude poderiam gerar resultados ainda mais atrativos.

No Ocidente, especialmente nos países europeus, a estratégia mais empregada na busca da melhoria dos resultados de tratamento dos pacientes com câncer gástrico localmente avançado se baseou no emprego da chamada quimioterapia peri-operatória, administrada antes e após o procedimento cirúrgico. Esta abordagem visa o tratamento precoce da doença micro-metastática, a regressão patológica (*downstaging)* do tumor, permitindo maiores taxas de ressecções completas e, ao mesmo tempo, garantir que um maior percentual de pacientes recebam o tratamento sistêmico devido à melhor tolerância ao mesmo antes do procedimento cirúrgico. Os estudos iniciais que validaram esta abordagem foram o *MAGIC TRIAL*, de 2006, onde os pacientes foram randomizados para receberem terapia sistêmica perioperatória com ECF (Epirrubicina, Cisplatina e Fluorouracil) (Cunningham et al. 2006) ou cirurgia exclusiva e o *ACCORD 07* onde o esquema de quimioterapia incluía Cisplatina e Fluorouracil (Ychou et al. 2011). Em ambos, os pacientes com tratamento multimodal apresentaram ganho de sobrevida global e livre de recorrência, maiores taxas de ressecção R0 e com maior percentual de pacientes estadiados com tumores ypT0-1-2 e ypN0-1, caracterizando o *downstaging* patológico. A tolerância ao tratamento sistêmico ficou também claramente caracterizada como dependente do momento em que o mesmo é administrado em ralação à cirurgia, sendo que apenas 55% dos pacientes no MAGIC TRIAL e 48% dos arrolados no estudo francês

conseguiram completar os ciclos previstos para a etapa pós-operatória frente a taxas superiores a 90% de completude para o tratamento neoadjuvante.

Um dado interessante nesta estratégia de tratamento perioperatório é que aparentemente a adição de radioterapia ao esquema proposto, quer seja no cenário neoadjuvante (POET TRIAL), quer seja no pós-operatório (CRITICS TRIAL) não resultou em benefício de sobrevida quando comparado à quimioterapia isolada (Stahl et al. 2009; Verheij et al. 2016), pendente ainda o resultado do TOPGEAR TRIAL, ainda em fase de recrutamento (Leong et al. 2017).

Mais recentemente, dois estudos importantes vieram a clarificar ainda mais esta estratégia de terapia perioperatória. Considerando-se dados de eficácia e toxicidade, o estudo OE05 TRIAL objetivou determinar a necessidade da adição de antracíclicos, especificamente a epirrubicina (Epirrubinica, Cisplatina e Xeloda – ECX) a esquemas contendo fluoropirimidinas e platina (Cisplatina e fluorouracil – CF) em pacientes com adenocarcinoma gástrico e de transição (Alderson et al. 2017). Após a inclusão de 897 pacientes o estudo demonstrou não haver benefício de esquema com três drogas neste cenário, ao menos quando o terceiro agente é um antracíclico.

Apresentado em plenária do congresso americano de oncologia em 2017, o estudo FLOT4-AIO TRIAL (Al-Batran et al. 2017), considerado por muitos a referência standard para tratamento do câncer gástrico localmente avançado, levou dois anos para ter seus resultados publicados. Neste estudo, pacientes com câncer gástrico e de transição esôfago-gástrica estadiados como cT2 ou maior e/ou cN+ e cM0 foram randomizados para receberem em esquema perioperatório, FLOT (Docetaxel, Oxaliplatina, Leucovorin e Fluorouracil) ou ECF / ECX (Epirrubicina, Oxaliplatina e Fuorouracil ou Capecitabina). Com um seguimento mediano de 43 meses, o grupo experimental demonstrou ganho de sobrevida mediana de 15 meses (50 versus 35 meses) em comparação ao grupo com esquema baseado em antracíclico (HR 0.77; 95% CI: 0.63 – 0.94; p=0.012). Além disto o esquema incluindo taxano produziu maior taxa de regressão tumoral e maior proporção de ressecções R0 (Al-Batran et al. 2019). Para pacientes mais idosos e/ou com performance não ótima fica a opção de esquemas baseados em duas drogas, sendo o FOLFOX – Fluorouracil, Leucovorin e Oxaliplatina – amplamente utilizado na prática clínica.

Mesmo com esta evolução de resultados demonstrada, como dito anteriormente, uma parcela significativa dos pacientes é diagnosticada com doença metastática ou recorrem após um tratamento com intenção curativa. Esquemas semelhantes aos mencionados no cenário perioperatório têm sido empregados em primeira linha de casos diagnosticados metastáticos,

com destaque para a adição de Traztuzumab naqueles com hiper-expressão do HER2. Regimes baseados em irinotecano (com ou sem a adição de 5-FU), docetaxel e paclitaxel com ou sem ramucirumabe são considerados opções em segunda linha (Kang et al. 2012, Magalhães et al. 2018).

Motivados pelo entendimento dos mecanismos de evasão ao sistema imune previamente mencionados, assim como em várias neoplasias sólidas, vem crescendo o interesse pelo uso dos chamados inibidores de *Checkpoint* imunes em pacientes com câncer gástrico, sendo que os dados mais consolidados apontam para um benefício em parcela selecionada de pacientes em terceira ou maior linhas de tratamento. Deste modo, dois agentes anti-PD1 foram aprovados para uso neste cenário: o Nivolumabe, no Japão, baseado em resultados do estudo ATTRACTION 2 (Kang et al. 2017) e o Pembrolizumabe, no ocidente (incluindo o Brasil), de acordo com o a coorte 1 do KEYNOTE-059 TRIAL (Fuchs et al. 2018). Um grande desafio nestas estratégias é sem dúvidas a seleção de pacientes com maior chance de se beneficiar do uso desta classe de tratamento, ferramenta até agora sem consenso na prática clínica. No estudo Japonês, por exemplo, não houve seleção de pacientes baseada em expressão de PD1 ou PD-L1 e o benefício do tratamento foi também independente deste status, embora uma minoria dos pacientes tenha sido efetivamente testada. Por outro lado, na primeira coorte do estudo Keynote-059, embora também não tenha havido o critério de positividade de expressão de PD-L1 para recrutamento, todos os pacientes foram testados, sendo o mesmo considerado positivo em 57.1% dos casos. A taxa de resposta global foi maior em pacientes com PD-L1 positivo e que receberam o tratamento em terceira linha (22.7%) quando comparado a linhas posteriores (6.4%) ou com pacientes PD-L1 negativo (8.6%).

1.5 RESPOSTA PATOLÓGICA E SOBREVIDA

Desde que o tratamento perioperatório se tornou rotina em diversos centros do mundo, duas características desta estratégia, não importa os agentes empregados, se destacaram como potenciais benefícios mensuráveis: a maior taxa de ressecção R0 e a resposta patológica induzida. Como mencionado anteriormente, é comum aos estudos que empregaram algum tipo de tratamento pré-operatório o achado de uma maior taxa de ressecções completas, atribuída ao *downsizing* tumoral ou, em outras palavras, à diminuição do tamanho das lesões e o clareamento de suas margens de relação com outras estruturas. O benefício clinico de ressecções R0 (margens microscópicas negativas) já foi sobejamente demonstrado em várias neoplasias, não sendo os tumores gástricos e de TEG exceções.

Sobre a resposta patológica, no entanto há mais controvérsia. Diferentes padronizações desta análise têm sido empregadas e não há um consenso sobre qual a maneira mais fidedigna e reprodutível de se reportar estes achados. Conta-se na literatura em dias atuais cinco sistemas de gradação de resposta patológica neste cenário: Mandard-TRG, a escala da Associação Japonesa de Câncer Gástrico (JGCA-TRG), o sistema do Colégio Americano de Patologistas (CAP-TRG), o sistema Chinês e a Classificação de Becker (Zhu et al. 2017). As duas classificações mais utilizadas, quais sejam a de Mandard (*Tumor Regression Grading – TRG*) (Mandard et al. 1994) e a de Becker et al. (2011) tentam aquilatar o significado de achados tais como a presença e o percentual de células tumorais viáveis residuais, bem como a presença de fibrose no leito tumoral pós neoadjuvância. Ambas apresentam prós e contras na literatura incluindo a reprodutibilidade e a variabilidade inter-observadores e principalmente um impacto oscilante em termos de prognóstico, com dados mais favoráveis ora à uma, ora a outra e às vezes à nenhuma (Tomasello et al. 2017; Hu et al. 2019; Xu et al. 2019).

O que vislumbramos, e parece ser esta também a percepção de outros pesquisadores, é que, embora as categorias estabelecidas por estas classificações distingam de modo significativo pacientes em diferentes estratos de sobrevida, este impacto se dilui no estadiamento patológico pós neoadjuvância (ypTNM) (Coimbra et al. 2019). Os fatores que predizem estes padrões de resposta, bem como sua correlação com características moleculares que se revelam importantes na definição de condutas terapêuticas tais como o status de instabilidade de microssatélites, a hiper-expressão do HER2 e a expressão do PD-L1 têm sido intensamente debatidos na literatura recentemente (Choi el al. 2019) e nos parece oportuna análise semelhante em nosso meio.

1.6 SELEÇÃO DE PACIENTES PARA AS MELHORES ESTRATÉGIAS: UM DESAFIO EMERGENTE

Baseada nestes resultados, há na literatura uma crescente discussão a respeito do melhor marcador de predição de resposta a esta terapia em casos de adenocarcinoma gástrico, especialmente na perspectiva de emprego dos inibidores de *checkpoint* em linhas mais precoces de tratamento, incluindo o cenário perioperatório e adjuvante (Mheta et al. 2018). Uma meta-análise recente demonstrou que a expressão de PD-L1 por imuno-histoquímica é preditor de resposta a inibidores do eixo PD1/PD-L1 entre mais de quarenta tipos de tumores sólidos estudados (Khunger et al. 2017).

Há, porém, falta de consenso na literatura tanto no que diz respeito à uniformidade de parâmetros utilizados para se quantificar esta expressão quanto sobre quais valores de *cut-off* teriam significativo impacto na prática clínica. Sem este consenso, os estudos com drogas inibidoras de *checkpoint* têm utilizado diferentes parâmetros de imuno-histoquímica para a detecção da expressão de PD-L1 em diferentes cenários, quando não simplesmente suprimem este dado. Em cada estudo e para cada neoplasia também o clone proteico específico para esta análise varia, criando uma correlação anticorpo – droga que complica a aplicabilidade clínica e a reprodutibilidade da informação (Nivolumabe – Dako, 28-8 *antibody* / Pembrolizumabe – Dako 22c3 *antibody* / Durvalumabe – Ventana SP263 *antibody*). Além disto, a variabilidade inter e intra-tumoral e entre diferentes avaliadores também se apresentam como fatores limitantes (Gaule et al. 2017; Tran et al. 2017; Davis et al. 2019).

Recentemente, tem havido um crescente interesse nas propriedades imunes do microambiente tumoral incluindo a densidade de Linfócitos CD8+ infiltrando a neoplasia, bem como a presença de outras células imunes tais como macrófagos, plasmócitos e histiócitos. O entendimento do papel deste infiltrado bem como da importância da expressão das proteínas de *checkpoint* imunes também nestas células, em especial o PD-L1, levou à utilização de critérios distintos de análise e que se mostraram úteis em diferentes histologias, como o *Tumor Proportion Score* (TPS) para câncer de pulmão não pequenas células e o *Combined Positive Score* (PCS) para adenocarcinomas gastroesofágicos (Kulangara et al. 2019).

A aplicabilidade destes dois critérios tem sido comparada em diferentes cenários clínicos. Tecnicamente, o TPS é calculado como a percentagem de células tumorais viáveis com imunorreatividade parcial ou completa de membrana de qualquer intensidade. O CPS, por sua vez, consiste em um score calculado pela divisão do número de células PD-L1 positivas (células tumorais, linfócitos e macrófagos) pelo número total de células tumorais viáveis e multiplicado por 100. Em uma comparação em casos de câncer gástrico e de colo uterino, o TPS mostrou-se menos sensível que o CPS em detectar pacientes com câncer gástrico com benefício de sobrevida pelo uso da terapia anti-PD-1 com pembrolizumabe, tanto em *cut-offs* de 1 e 10 (Kulangara et al. 2018). Além disto, em pacientes não expostos à quimioterapia e com tumores gástricos localmente avançados e não metastáticos, pesquisadores japoneses demonstraram uma positividade muito mais alta para a expressão do PD-L1 pelo CPS que pelo TPS (71.7% versus 20.4%), inclusive com sua associação com prognóstico sendo caracterizada apenas com esta primeira metodologia (Yamashita et al. 2020), reforçando o seu emprego nesta população.

Além destas análises não padronizadas da expressão das proteínas inibidoras de *check points* imunes em si, outras correlações têm sido tentadas no sentido de se reforçar o caráter preditor de resposta à esta classe de tratamento. O estudo seminal do papel do bloqueio de PD-1 em neoplasias com Instabilidade de Microssatélites (Le et al. 2015) reforçou este achado como preditor independentemente deste benefício mesmo quando comparado à expressão do próprio substrato terapêutico e levou à chamada indicação agnóstica, independente do sítio primário,, para a terapia anti-PD1 neste cenário de tumores. Especificamente em câncer gástrico, os dados do TCGA apontam para uma proporção de casos com Instabilidade de Microssatélites de 22%, número este não reproduzido em séries de doença locorregional, onde uma variação de 8 a 17% é descrita (Vraná et al. 2018). Em análises não planejadas de estudos de tratamento sistêmico associado à este cenário de doença locorreginal inclusive, a presença de MSI-H foi fator preditor de melhor prognóstico e de não resposta à terapia sistêmica empregada, levantando a hipótese que o perfil de maior antigenicidade que esta alteração produz geraria um microambiente tumoral onde a ativação dos mecanismos de defesa imune pudessem exercer um melhor papel no controle da doença (Smyth et al. 2017; Choi et al. 2017, 2019). E finalmente, a ferramenta que parece carregar a maior precisão nesta predição de resposta à imuno-terapia parece ser a Carga Mutacional Tumoral – o *Tumor Mutation Burden*. Em painéis comercialmente disponíveis para a determinação desta variável foi demonstrado que cerca de 5% dos pacientes testados com adenocarcinoma gástrico apresentavam um resultado de acima de 20 mutações / MB, o que os caracterizaria como tento um alto TMB e uma maior chance de resposta à imuno-terapia. Embora a presença de hiper-expressão do PD-L1 e de MSI-H pareçam positivamente associadas à um alto TMB, dados apontam para uma correlação não perfeitamente linear nestes parâmetros (Klempner et al. 2017) e levantam a possibilidade de outras variáveis, tal como o chamado fenótipo *T-Cell inflamade* , um conjunto de tumores com hiper-expressão de genes associados ao interferon γ e presentes em vários subtipos de câncer gástrico poderem ampliar o poder de predição de resposta à estas novas estratégias terapêuticas (Maron et al. 2017).

Dados de qual a padronização do critério de positividade, de inclusão ou não do infiltrado inflamatório nesta análise e principalmente do momento em relação ao tratamento (se antes ou após a quimioterapia neoadjuvante), bem como da amostra tumoral utilizada para a pesquisa de expressão destas proteínas são contraditórios na literatura e ausentes em casuísticas nacionais. Encontra-se, até recentemente, uma grande variabilidade nas taxas de expressão de PD-L1 (8,8% a 71,7%) em amostras de câncer gástrico a depender da região do mundo em que as coortes foram analisadas, do estadio em que os pacientes foram arrolados e da metodologia

empregada na detecção (Pereira et al. 2018; Yamashita et al. 2020). Em uma grande coorte alemã publicada em 2017 um achado intrigante reforça a importância desta seleção de amostras uma vez que 33.1% dos casos tidos como PD-L1 positivos na análise da peça operatória apresentavam células com esta expressão apenas no centro do tumor ou no *front* de invasão e não na superfície luminal da neoplasia, tornando estes casos provavelmente negativos se apenas uma biópsia fosse analisada (Böger et al. 2017). Além disso, a concordância desta expressão entre sítios primários e metastáticos foi de 80%. E não está claro na literatura o impacto da realização de tratamento sistêmico neste perfil de expressão, incluindo se a resposta patológica maior ou menor seria um fator corroborante para esta mudança e menos ainda se a positividade ou não da expressão proteica do PD-L1 neste contexto carrega valor prognóstico melhor ou pior ou se mantém a capacidade de predição de resposta aos inibidores do eixo PD1/PD-L1.

2 JUSTIFICATIVA

Tal como em outros tumores sólidos, o emprego da imunoterapia para pacientes com câncer gástrico tende a crescer, a despeito da carência de ferramentas de seleção adequada e uniforme dos melhores candidatos ao seu uso. Outro fato relevante é a existência de dados consistentes demonstrando significativas diferenças regionais de positividade para a expressão de proteínas relacionadas à evasão imune e de resposta observada à estas terapias neste cenário, o que, *per si*, justifica sua investigação em nosso meio onde, até o momento, apenas um estudo avaliou esta expressão, com critério diverso ao mais utilizado e aceito na literatura especializada (Pereira et al. 2018). Não se encontra na literatura, também, uma análise do impacto da realização de quimioterapia e da resposta ao tratamento sistêmico na expressão proteica de PD-L1. E, finalmente, é controverso o papel prognóstico deste achado, pelo que consideramos fundamentais análises adicionais em coortes de pacientes submetidos ao tratamento considerado *standard* para esta neoplasia nos dias atuais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

1 Determinar a expressão proteica do PD-L1 pelo CPS em amostras tumorais de adenocarcinomas gástricos e de junção esôfago-gástrica provenientes de biópsias pré-tratamento e em peças cirúrgicas após a quimioterapia neoadjuvante.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

1 Descrever os fatores clinico-patológicos relacionados com a expressão do PD-L1;

2 Avaliar os resultados de sobrevida global e livre de doença nesta população e correlacionar com a expressão do PD-L1 e outros fatores prognósticos clinico-patológicos.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Este é um estudo de coorte retrospectiva.

4.2 PACIENTES

O estudo endereçou pacientes com diagnóstico histológico confirmado de adenocarcinoma gástrico e de transição esofagogástrica, estadios clínicos IB - III, submetidos a quimioterapia neoadjuvante seguido de cirurgia com intuito curativo no A.C.Camargo Cancer Center no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2017, totalizando 270 casos. Os dados relacionados às variáveis clínicas, epidemiológicas, dos tratamentos clínicos neoadjuvante e adjuvantes, do tratamento cirúrgico, da avaliação da resposta patológica e do desfecho da sobrevida foram extraídos do banco de dados mantido prospectivamente pelo Núcleo de Cirurgia Abdominal desta instituição desde 2006.

Os critérios de inclusão foram:

- Pacientes com diagnóstico histológico comprovado de adenocarcinoma gástrico, incluindo aqueles cuja lesão se encontra na transição esôfago-gástrica, porém classificados como Siewert II ou III;
- Tratamento quimioterápico e cirúrgico (gastrectomias totais ou subtotais) obrigatoriamente realizados no A.C.Camargo Cancer Center, no período estudado;
- Cirurgias definidas como sendo de intuito curativo no momento da indicação.

Os seguintes critérios de exclusão foram adotados:

- Pacientes com tumores do coto gástrico, uma vez que estes casos representam um grupo de doentes com padrão de disseminação e fatores prognósticos distintos dos demais;
- Pacientes com tumores descritos como de esôfago distal ou de transição esofagogástrica classificados como Siewert I ou que tenham sido submetidos a esofagectomia como cirurgia principal;
- Pacientes estadiados, previamente à quimioterapia, como portadores de doença metastática; neste caso, o tratamento sistêmico não se configura como neoadjuvante;

- Ausência de material anatomopatológico (biópsia e/ou peça cirúrgica) que permita a realização das análises imuno-histoquímicas necessárias, bem como, a avaliação das variáveis da resposta patológica pretendidas, sendo estes casos considerados apenas nas análises de sobrevida da coorte como um todo;
- Tumores de histologia mista tal como neoplasias adenoescamosas e adenoneuroendócrinas.

4.3 VARIÁVEIS

As seguintes variáveis clínicas e de estadiamento pré-operatório foram levantadas:

- Idade;
- Gênero;
- Índice de Massa Corpórea (IMC);
- Classificação de risco da Associação Americana de Anestesiologia (ASA);
- Comorbidades identificadas no pré-operatório;
- Localização da lesão na endoscopia prévia à quimioterapia;
- Alterações radiológicas identificadas na tomografia computadorizada de abdome e pelve utilizada para estadiamento e/ou à ecoendoscopia quando este exame tiver sido realizado:
    - Espessamento de parede do estômago (T3) ou perda da definição da camada externa do órgão (T4)
    - Linfonodos > 8mm no menor eixo e/ou realce anormal ou necrose central (N+);
- Achado de infiltração de serosa (T4a) ou comprometimento linfonodal à laparoscopia estadiadora pré quimioterapia;
- Estadiamento clínico agrupado pelo TNM 8ª edição (Amin et al. 2018).

Os dados referentes ao tratamento neoadjuvante empregado coletados foram: o esquema de tratamento, duração e perfil de toxicidade e re-estadiamento clínico pós-neoadjuvância.

As variáveis relativas ao procedimento cirúrgico anotadas incluíram: tempo operatório, necessidade de transfusões sanguíneas durante a cirurgia, complicações clínicas e cirúrgicas pós-operatórias (graduadas pelo *Classificação de Clavien-Dindo* – Anexo 1) (Dindo et al. 2004), tempo de internação, necessidade de re-internação e óbito em até 60 dias de pós-operatório.

Também foram coletadas as informações relativas ao tratamento adjuvante e de seguimento oncológico após o término do tratamento multimodal.

4.4 AVALIAÇÃO ANATOMO-PATOLÓGICA E DA EXPRESSÃO PROTEICA DO PD-L1

Os exames anatomopatológicos destes pacientes foram revisados e as seguintes variáveis descritas: tipo histológico de Laurén (1965); número de linfonodos dissecados e comprometidos; profundidade de invasão da parede do órgão; o status de HER2 e o estadiamento patológico pós neoadjuvância (ypTNM) segundo a AJCC 8ª Edição (Amin et al. 2018).

A avaliação da resposta patológica tumoral ao tratamento neoadjuvante foi feita através das análises microscópicas de toda a lesão residual ou do leito tumoral da peça cirúrgica. O protocolo de processamento macroscópico institucional utilizado inclui:

- A localização, quando possível, da lesão ao exame macroscópico e a abertura longitudinal pela grande curvatura da peça, sem transfixar a lesão; marcação com o corante as margens distal e proximal.
- Realização de cortes que incluam toda a área tumoral macroscópica ou lesão residual (leito tumoral) em toda a sua profundidade; inclusão de fragmentos representativos das margens radial, proximal e distal.
- Assegurar-se de incluir fragmentos da transição entre a lesão e mucosa não neoplásica.
- Representação de fragmentos da mucosa não neoplásica. Se possível, representar corpo e antro, incluindo pequena e grande curvatura.

Para graduação da resposta patológica do tumor ao tratamento neoadjuvante, utilizamos a percentagem relativa de células viáveis e também a categorização proposta por Becker et al. em 2011, que segue:

Grau 1: resposta completa ou subtotal.

Grau 1a: (0% de células tumorais viáveis).

Grau 1b: (< 10% de células tumorais viáveis).

Grau 2: regressão tumoral parcial (10-50% de células tumorais viáveis).

Grau 3: regressão mínima ou sem resposta (> 50% de células tumorais viáveis).

As percentagens relativas de fibrose no leito tumoral foram também anotadas.

Para permitir as análises comparativas um *Tissue Microarray* (TMA) foi construído com amostras em duplicatas de cada área representativa da neoplasia extraídas dos blocos das peças cirúrgicas, após reanálise dos cortes histológicos corados com Hematoxilina-Eosina. Através do exame de microscopia óptica as áreas representativas do tumor foram marcadas e procedeu-se então à marcação do bloco de parafina (doador) na área escolhida, com caneta permanente. Utilizando-se o *tissue microarrayer* (Beecher Instrument, Silver Springe, MD, USA) foram extraídos os cilindros das áreas marcadas e os mesmos transferidos para novos blocos de parafina (bloco receptor). Cada caso foi representado pelo menos em duplicata com a obtenção de dois cilindros de 1mm cada de áreas representativas e distintas da neoplasia. A depender da disponibilidade de material e heterogeneidade das áreas tumorais alguns casos foram representados em mais de uma área da peça cirúrgica. Para a análise das biópsias pré-neoadjuvância, novos cortes dos blocos de parafina foram utilizados e plotados em lâminas contendo 3-4 casos com vistas a preservar os blocos originais do desgaste que a confecção do TMA poderia gerar em amostras escassas de tecido tumoral, bem como permitir a otimização da quantidade de reagente necessária para a imuno-histoquímica.

A expressão proteica do PD-L1 foi pesquisada por imuno-histoquímica utilizando-se o kit PD-L1 IHC 22c3 PharmDX (Dako North America, Agilent Technologies, Carpinteria, California) segundo padronização que tem sido empregada na prática clínica para determinar o possível benefício da utilização de terapia anti-PD1 (Pembrolizumabe) em pacientes com câncer gástrico avançado (Kulangara et al. 2019). Os procedimentos foram realizados no *Core Facility* de Histologia-IHQ-TMA do A.C.Camargo Cancer Center. Os blocos de parafina das biópsias gástricas e o TMA confeccionado a partir das peças cirúrgicas foram seccionados no micrótomo (Leica, RM2255) na espessura de 4 µm. As lâminas foram posteriormente imunomarcadas com o anticorpo anti-PD-L1 (cat. SK006, DAKO) utilizando o sistema *Autostainer* Link 48 conforme instruções do fabricante (Agilent Dako 2020). Brevemente, os cortes foram submetidos a desparafinização e recuperação antigênica com a solução de recuperação de baixo pH EnVision FLEX (cat. K800521-2, Dako) por 20 min a 97ºC. Após as lavagens, as lâminas foram então marcadas com o anti-PD-L1 e contracoradas com hematoxilina. As lâminas foram montadas com meio de montagem Entellan (cat. 107961, Merck) e enviadas para avaliação histopatológica.

A análise do resultado obtido foi computada pelo CPS – *Combined Positive Score* conforme o seguinte:

$$CPS = \frac{\text{\# Células PD-L1 positivas (Células tumorais, linfócitos e macrófagos)}}{\text{\# Total de Células Tumorais Viáveis}} \times 100$$

A escolha desta metodologia de análise pretendeu reproduzir o cenário utilizado na prática clínica e também atender às evidências de que a expressão do PD-L1 em células imunes intra e peritumorais tem papel importante na manifestação do fenótipo de evasão imune e que, por isso, provavelmente o CPS expressa melhor o papel prognóstico de tal achado que o TPS (Yamashita et al. 2020).

O resultado foi expresso de forma categorizada como amostra PD-L1(+) quando este escore foi igual ou superior a 1 e casos PD-L1 (-) quando o mesmo foi menor que 1, tanto para as lâminas das biópsias quanto para o TMA com peças cirúrgicas pós neoadjuvância. A análise da expressão com o valor do CPS tomado de forma contínua também foi realizada. Um paciente foi considerado com PD-L1 positivo caso apresentasse ao menos uma amostra com CPS maior ou igual a 1 (em biópsia e/ou peça cirúrgica). Em caso de discordâncias entre as amostras de um mesmo paciente, o escore mais alto foi o considerado. A análise foi feita por patologista com expertise e treinamento específico na leitura deste teste. Os controles utilizados foram os disponibilizados pelo kit, representados por lâminas contendo seções de duas linhagens celulares granulares embebidas em parafina e fixadas em formalina: NCI-H226 com expressão moderada de PD-L1 e MCF-7 com expressão negativa de PD-L1.

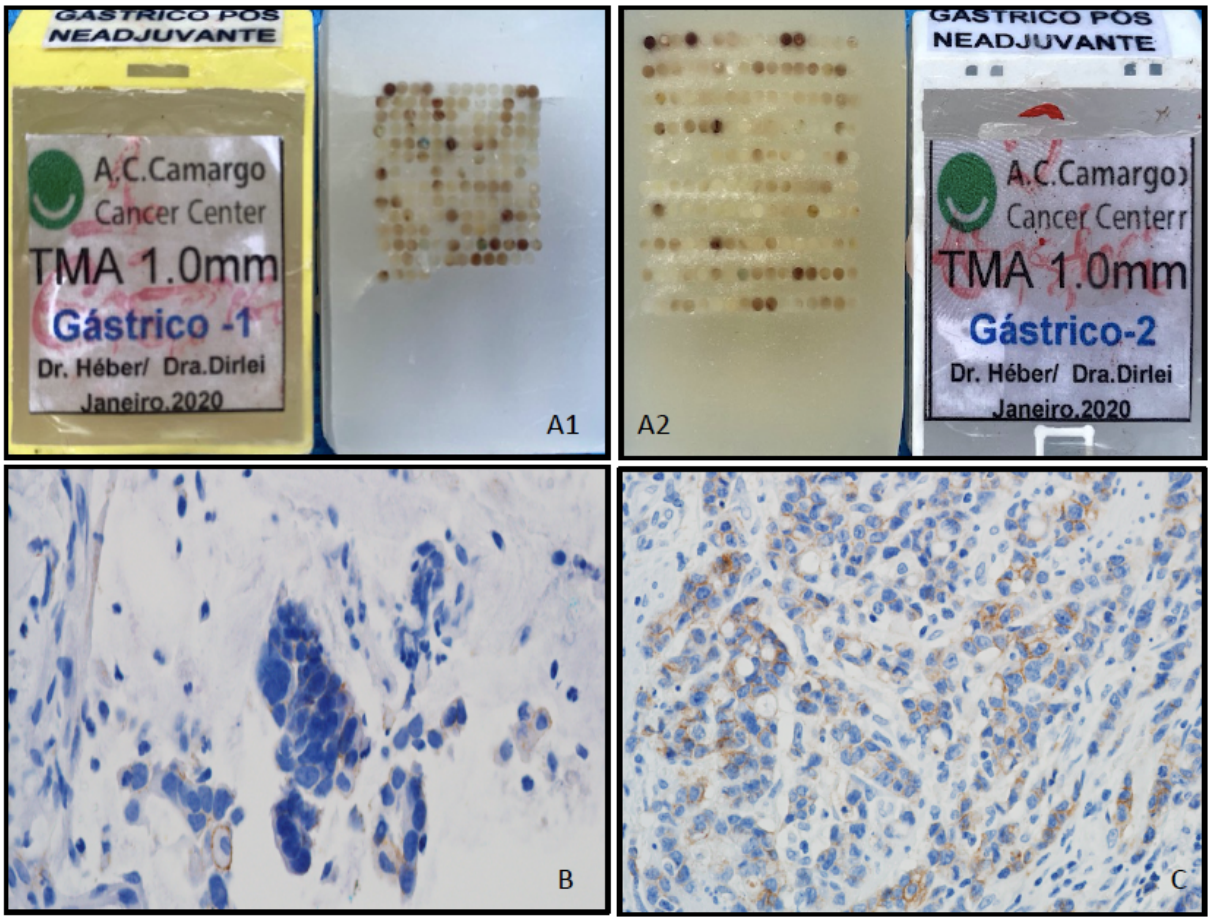


Figura 2 - Confecção do TMA e análise do PD-L1 em biópsias e peças cirúrgicas. A. Imagem do Bloco de TMA após sua confecção: A1 – Bloco 1; A2 – Bloco 2. B. Caso PD-L1 positivo em lâmina de biópsia (aumento original 40x). C. Caso positivo em análise de peça cirúrgica pelo TMA (aumento original 40x).

4.5 DESFECHOS AVALIADOS

A sobrevida global foi definida como o intervalo, em meses, entre a data de início do tratamento neoadjuvante e o momento do óbito por qualquer causa, ou última informação clínica disponível. A sobrevida livre de doença consistiu no intervalo, também em meses, entre a data da cirurgia e a ocorrência de óbito por qualquer causa ou data da recidiva tumoral. A ausência do paciente em duas visitas clínicas consecutivas e/ou ausência de informações, além desta data, foi definida como perda de seguimento.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A mensuração das variáveis quantitativas foi expressa pela medida de tendência central adequada (média ou mediana) com respectivas medidas de dispersão (desvio-padrão ou intervalo interquartil). Para a comparação entre grupos, para variáveis numéricas com distribuição normal foi realizado o teste T de Student; para variáveis numéricas sem distribuição normal optamos pelo teste de Mann-Whitney; para variáveis categóricas foi utilizado o teste do qui-quadrado de Pearson, ou nos casos de frequências menores que 05 dentro de uma tabela maior que 2x2, a opção foi pelo Teste Exato de Fischer. Para a comparação da expressão do PD-L1 em amostras pareadas antes e após o tratamento neoadjuvante foi utilizado o Teste de McNemar. Para todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

A análise da sobrevida global e livre de doença foi realizada pelo estimador produto-limite de Kaplan-Meier e a comparação das curvas feita através do teste de "log-rank". As variáveis que tiveram $p < 0,20$ pelo teste de log-rank, foram selecionadas para a análise múltipla utilizando o modelo de riscos proporcionais de Cox. Valores de HR crus e ajustados foram descritos acompanhados dos IC 95%. As análises foram feitas nos softwares Statistical Package for the Social Sciences (SPSS – versão 22 IBM Corp., Armonk, NY) ou no STATA versão 14 (StataCorp, College Station, TX).

4.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, mantenedora do A.C.Camargo Cancer Center, em 04/06/2019 sob o registro 2685/19 (Anexo 2) com dispensa do consentimento pós-informado pelo caráter retrospectivo do mesmo.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

No período analisado, 726 pacientes com diagnóstico de tumores de estômago e transição esôfago-gástrica foram avaliados no Departamento de Cirurgia Abdominal do A.C.Camargo Cancer Center. A Figura 3 demonstra o fluxo de seleção de casos incluídos nesta análise após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão. Duzentos e setenta (270) pacientes foram inicialmente estadiados como não metastáticos, realizaram quimioterapia neoadjuvante e foram submetidos à cirurgia, sendo esta a amostra considerada para as análises da sobrevida global e livre de doença. Foi possível a recuperação dos blocos de parafina de biópsias pré-tratamento de 132 pacientes (1 bloco por paciente = 132 amostras); Após a seleção das áreas representativas dos tumores pós-neoadjuvância nas peças cirúrgicas, foram selecionadas para a confecção do TMA 161 amostras de 97 pacientes, assim distribuídas: 53 pacientes com uma amostra, 27 pacientes com duas, 15 pacientes com 3 amostras, 1 paciente com 4 amostras e 1 paciente com 5 amostras. Em 58 pacientes apenas as biópsias estavam disponíveis, em 23 apenas amostras de peças cirúrgicas foram encontradas e em outros 74 pacientes tanto as biópsias pré-neoadjuvância quanto os blocos das peças cirúrgicas pós neoadjuvância foram recuperados, constituindo estes últimos a coorte de pacientes com amostras pareadas. Assim, um total de 293 amostras foram analisadas (132 de biópsias e 161 de peças) mas, considerando-se a superposição de amostras de biópsia e peças num mesmo caso, o número considerado para o cálculo da expressão do PD-L1 na coorte foi 155 pacientes (58 apenas com biópsia, 74 pacientes com amostras pareadas e 23 apenas com peças cirúrgicas).

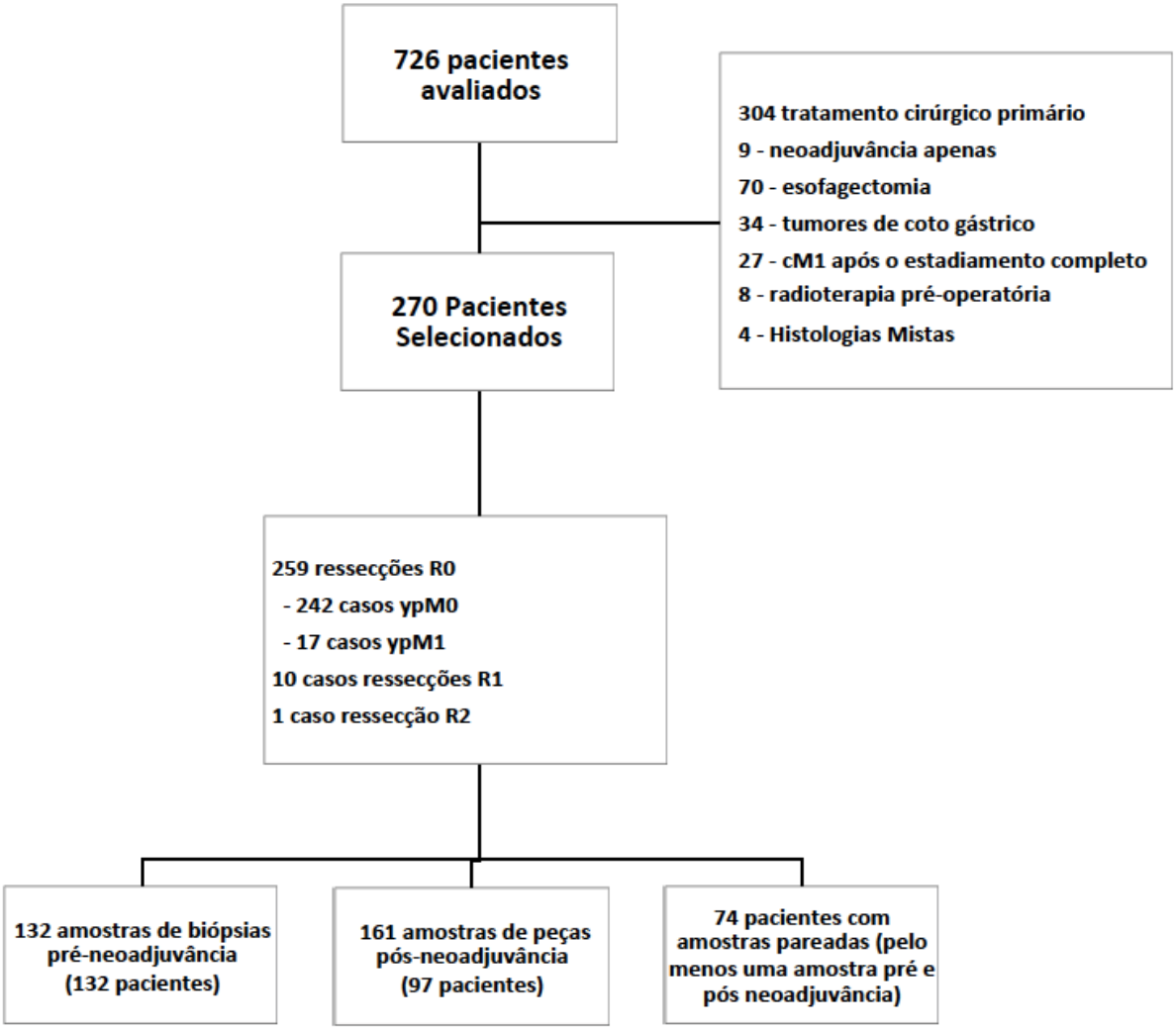


Figura 3 - Seleção da população de estudo e disponibilidade de blocos de parafina dos tumores para análise imuno-histoquímica de PDL-1.

Dentre os 270 casos analisados, a maioria era do sexo masculino (59,4%) com média de idade de 58,6 anos (22 – 83 anos). Mais de 75% dos casos foram classificados como ASA 1-2, denotando uma importante seleção de casos com baixa expectativa de complicações peri-operatórias para o tratamento multimodal. Um percentual semelhante de pacientes apresentava tumores localizados no corpo (41,6%) e no antro (40,2%) ao passo que 18,1% apresentavam tumores de cárdia / fundo gástricos. Em todos, exceto um caso, a tomografia computadorizada foi o exame de imagem usado no estadiamento e a laparoscopia estadiadora foi realizada em 176 casos (65,2% da amostra). Baseado nestas ferramentas, 62,2% dos casos foram considerados com linfonodos clinicamente comprometidos (cN+) (Tabela 1). O subtipo histológico de Laurén mais frequente foi o difuso (45,2%), seguido do intestinal (42,2%) e do tipo misto (9,6%).

Tabela 1 - Caracterização da amostra de pacientes quanto às variáveis clinicas e do tumor primário.

Variável	N (N = 270)	%
Sexo		
Masculino	161	59,6
Feminino	109	40,4
Idade (anos)		
Média (dp)	58,9 (12,4)	
Comorbidades		
Ausentes	82	30,4
Presentes	188	69,6
ASA (n = 269)		
ASA 1-2	204	75,8
ASA 3-4	65	24,2
Localização do tumor no estômago		
Cárdia / Fundo	49	18,1
Corpo	109	40,4
Antro	112	41,5
Exames de Estadiamento		
Tomografia	269	99,6
RM	13	4,8
ECO-Endoscopia	33	12,2
Laparoscopia	176	65,2
PET-CT	35	13,0
Estadiamento Clínico		
cT2N0	7	2,6
cT3-4N0	95	35,2
cT1-2N+	29	10,7
cT3-4N+	139	51,5
Subtipo Histológico		
Difuso	122	45,2
Intestinal	114	42,2
Misto	26	9,6
Inclassificável	8	3,0
Expressão / Amplificação do HER2 (n = 139)		
Positivo	19	13,6
Negativo	120	86,4

Todos os 270 pacientes iniciaram a quimioterapia neoadjuvante, sendo os esquemas mais frequentemente utilizados os baseados em duas drogas (FOLFOX / XELOX / FLOX / CF – 156 casos) seguidos de esquemas baseados em três drogas (EOX / DCF / FLOT / ECX / ECF – 111 casos). A despeito dos esquemas variados, a tolerância à quimioterapia pré-operatória foi boa e 87,8% dos pacientes concluíram o tratamento proposto. Por outro lado, 84 pacientes não chegaram sequer a iniciar o tratamento sistêmico pós-operatório (incluindo 10 casos de óbitos pós-operatórios) e apenas 41,1% dos que iniciaram a quimioterapia adjuvante concluíram todo o tratamento planejado (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização do tratamento sistêmico perioperatório instituído e toxicidade.

Variável	N	%
Iniciaram o Tratamento Neoadjuvante	270	100%
Concluíram o Tratamento Neoadjuvante	237	87,8%
Esquemas de Quimioterapia (n = 270)		
Duas Drogas – Platina e Fluoropirimidinas	156	57,8%
Três Drogas (+ Epirrubicina)	69	25,6%
Três Drogas (+ Taxano)	42	15,6%
Outros	3	1,1%
Toxicidade Graus III/IV	51	18,9%
Gastrointestinal	27	10,0%
Hematológica	20	7,4%
Mucosite	11	4,1%
Iniciaram o Tratamento Adjuvante	186	68,8%
Concluíram o Tratamento Adjuvante	111	41,1%
Esquemas de Quimioterapia (n = 186)		
Duas Drogas – Platina e Fluoropirimidinas	132	71,0%
Três Drogas (+ Epirrubicina)	31	16,7%
Três Drogas (+ Taxano)	21	11,3%
Outros	2	1,1%
Toxicidade Graus III/IV	31	16,7%
Gastrointestinal	21	11,3%
Hematológica	11	5,9%
Mucosite	2	1,1%

Houve um discreto predomínio de gastrectomias subtotais (137 versus 133 casos de gastrectomias totais), (Tabela 3) com via de acesso laparotômica em aproximadamente 76% dos casos. Em 30 pacientes a ressecção multivisceral foi necessária. A linfadenectomia D2 foi realizada em 96% dos casos, com mediana de linfonodos dissecados de 33 (IQR 23 – 43). Em 17 casos, houve detecção intra-operatória de doença metastática, com ressecção cirúrgica completa destes focos em todos os casos. Ressecções incompletas ocorreram em 11 casos, dez deles por margens microscópicas comprometidas e um por doença residual macroscópica (ressecção R2). A mediana de tempo de internação foi de 9 dias e a morbidade global foi de 32%, sendo que a taxa de óbitos pós-operatórios (contabilizados em 60 dias) atingiu 3,5% (10 casos).

Tabela 3 – Caracterização do tratamento cirúrgico e da morbimortalidade pós-operatória

Variável	N (N = 270)	%
Extensão da ressecção		
Gastrectomia Total	133	49,3
Gastrectomia Sub-Total	137	50,7
Via de Acesso Cirúrgico		
Laparotômica	204	75,6
Minimamente Invasiva	66	24,4
Totalmente laparoscópica	44	16,3
Conversão	17	6,3
Robótica	5	1,9
Linfadenectomia		
D1	9	3,3
D2	261	96,7
N⁰ de Linfonodos Ressecados		
Mediana (*IQR*)	33 (23 - 43)	
Ressecção Multivisceral		
Sim	30	11,1
Não	240	88,9
Margens de Ressecção		
R0	259	95,9
R1	10	3,7
R2	1	0,4
Morbidade pós-operatória (Clavien)		
Nenhuma (Clavien 0)	176	65,2
Menor (Clavien 1 – 2)	48	17,8
Maior (Clavien 3 – 4)	46	17,0
Mortalidade Pós-operatória (60 dias)	10	3,7
Internação em dias (mediana – IQR)	9 (7 – 13)	

Após o tratamento neoadjuvante (Tabela 4), cerca de 47% dos casos foram classificados como ypT0-T2 e a maioria (51,5%) como ypN0. A taxa de resposta patológica completa (ypT0ypN0) atingiu 13% (35 casos). Por outro lado, 53% dos casos ainda apresentavam mais de 50% de células viáveis pela classificação de Becker, caracterizando regressão tumoral mínima (Grau 3).

Tabela 4 - Resultados das análises patológicas nas peças cirúrgicas pós tratamento neoadjuvante.

Variável	N (N = 270)	%
Estádio T		
ypT0	35	13,0%
ypT1	52	19,3%
ypT2	41	15,2%
ypT3	48	17,8%
ypT4a	88	32,6%
ypT4b	6	2,2%
Estádio N		
ypN0	139	51,5%
ypN1	36	13,3%
ypN2	43	15,9%
ypN3a	37	13,7%
ypN3b	15	5,6%
Estádio M		
ypM1	17	6,3%
Estadiamento patológico agrupado		
Resposta patológica completa	35	13,0%
Estádio I	63	23,3%
Estádio II	66	24,4%
Estádio III	89	33,0%
Estádio IV	17	6,3%
Resposta patológica (% células viáveis)		
0% (Grau 1a)	35	13,0%
< 10% (Grau 1b)	18	6,7%
10% - 50% (Grau 2)	74	27,4%
> 50% (Grau 3)	143	53,0%
Percentual de Fibrose no leito tumoral (mediana – IQR) (%)	30 (15 – 80)	

5.2 RESULTADOS DE SOBREVIDA

Com um tempo de seguimento mediano de 60,3 meses (IC 95% 54,7 – 65,8), as taxas de sobrevidas global e livre de doença medianas de toda a amostra não foram atingidas, conforme as Figuras 4 e 5. A taxa de sobrevida global em 5 anos atingiu 63,5% e a de sobrevida livre de doença 60,5%. Neste período, 76 pacientes apresentaram recidivas e 85 foram a óbito, 16 deles por outras causas que não a doença oncológica.

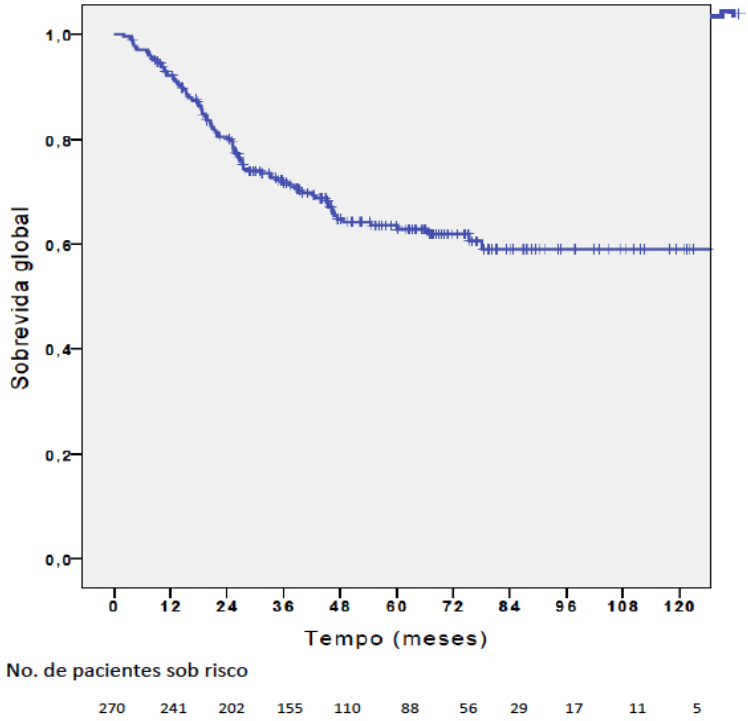


Figura 4 – Curva de sobrevida global de 270 pacientes com câncer gástrico tratados entre 2007 e 2017.

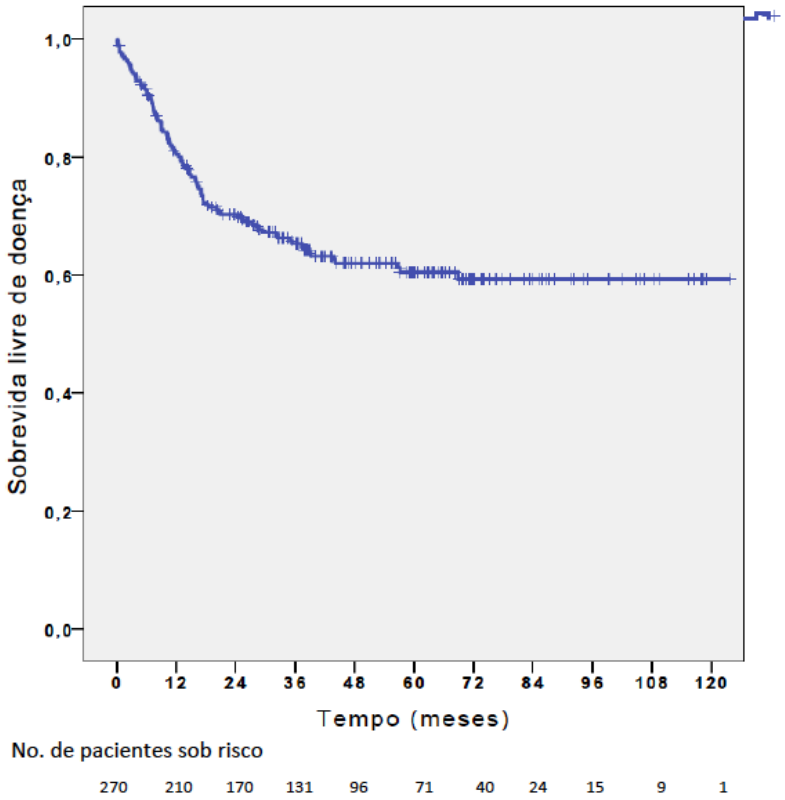
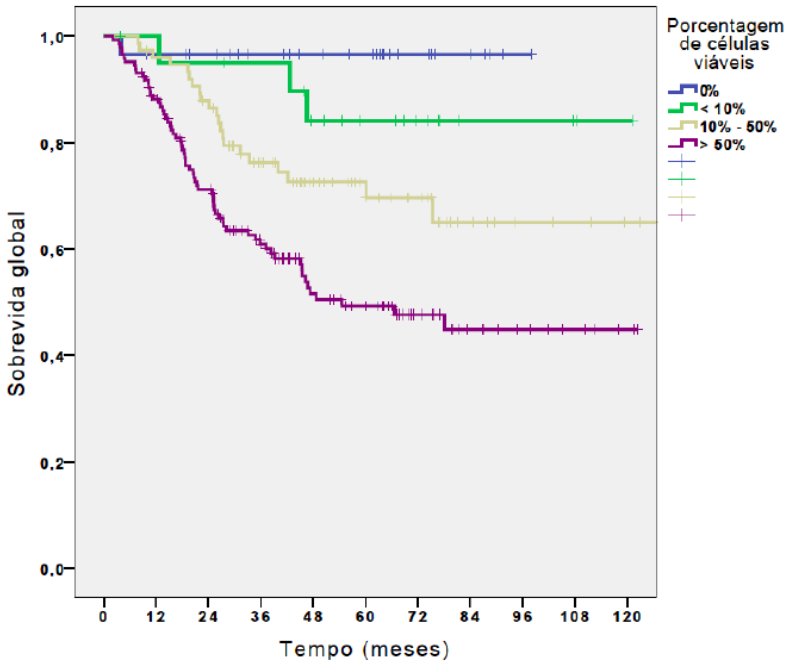


Figura 5 - Curva de sobrevida livre de doença de 270 pacientes com câncer gástrico tratados entre 2007 e 2017.

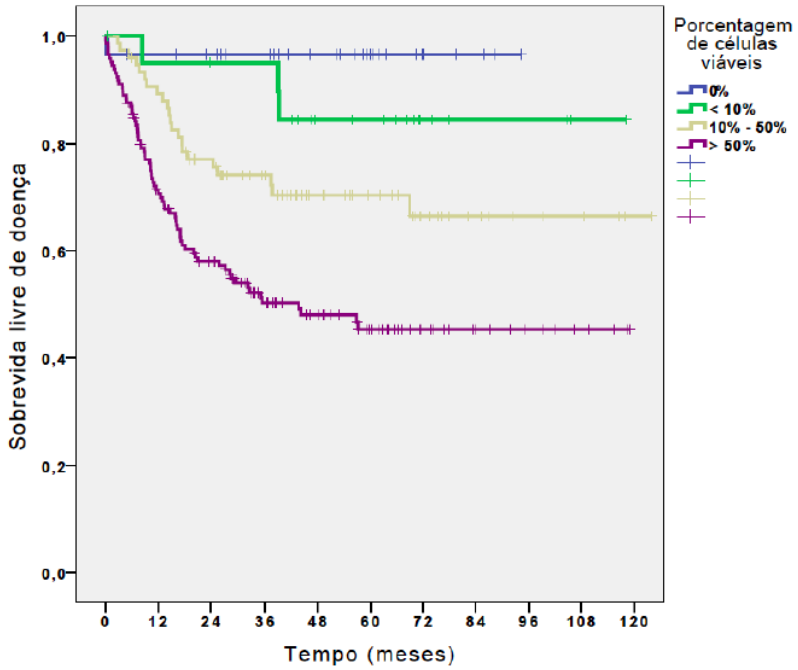
Quando analisados isoladamente, os dados da resposta patológica tumoral nas peças cirúrgicas pós neoadjuvância, categorizados de acordo com os estratos propostos por Becker et al. (2011), foram capazes de significativamente separar os pacientes segundo as taxas de sobrevida estimadas em cinco anos, tanto no que diz respeito à sobrevida global quanto à sobrevida livre de doença, com p<0,001 (Figuras 6 e 7). Nas análises das taxas de sobrevida global, os pacientes com Grau 1a (resposta patológica completa) apresentaram 96,6% de sobrevivência em 5 anos. Para aqueles com resposta Grau 1b (< 10% de células viáveis) este percentual atingiu 84,1%. Aqueles com resultado entre 10 – 50% de células viáveis (Grau 2) apresentaram 69,6% de SG em cinco anos e para os com mais que 50% de células viáveis (Grau 3) este percentual foi a 49,3%.



No. de pacientes sob risco

0%	35	32	30	24	20	17	9	6	3	0	0
< 10%	18	17	16	15	12	9	7	2	2	2	1
10 – 50%	74	70	62	46	31	24	18	9	5	4	2
> 50%	143	122	94	70	47	38	22	12	7	5	2

Figura 6 - Sobrevida global dos pacientes segundo a resposta patológica tumoral categorizada pelo percentual de células tumorais viáveis (p<0,001).



No. de pacientes sob risco

0%	35	33	29	25	19	13	7	5	2	0	0
< 10%	18	16	15	15	10	9	4	2	2	1	0
10 – 50%	74	64	51	39	26	20	12	7	5	4	1
> 50%	143	97	75	52	41	29	17	10	6	4	0

Figura 7 - Sobrevida livre de doença segundo a resposta patológica categorizada pelo percentual de células tumorais viáveis (p<0,001).

5.3 EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE PD-L1

Conforme citado anteriormente, foi possível a recuperação de material representativo das biópsias pré-neoadjuvância de 48,8% (132 / 270) dos pacientes e de blocos de parafina selecionados das peças cirúrgicas pós-neoadjuvância de 35% (97 / 270) de toda a coorte. Considerando-se situações com material apenas de biópsias, casos pareados (com amostras de biópsia e peça cirúrgica) e aqueles com material apenas de peças pudemos avaliar a expressão do PD-L1 em algum momento do tratamento em 155 pacientes (57%). A frequência de positividade para PD-L1 pelo método do CPS nestes 155 pacientes estudados foi de 20%, conforme a Tabela 5. Nas biópsias pré-neoadjuvância, 11,4% (15/132) das amostras foram consideradas como PD-L1 positivas com CPS mediano de 3,0 (IQR 2,0 – 7,5). Por outro lado, este percentual subiu para 16,7% (27/161) das amostras na análise das peças cirúrgicas pós-neoajuvância, com mediana de 9,0 para o valor do CPS (IQR 5,0 – 20,0) (Figura 8). Estas 27 amostras de peças cirúrgicas positivas ocorreram em 18 pacientes, ou seja 18,6% (18/97) da

coorte com material disponível após a neoadjuvância. Nestes, a seguinte distribuição foi observada: 12 pacientes com amostra única, 3 pacientes com 2 mostras, sendo que destes um apresentou uma amostra positiva e outra negativa, 2 pacientes com 3 amostras, sendo que em um deles duas amostras eram positivas e uma negativa (Caso 112 – Figura 9) e 1 paciente com 5 amostras . Em 58 dos 74 (78,4%) pacientes com amostras pareadas pré e pós-neoadjuvância, os resultados da expressão de PDL-1 em ambas as amostras foram similares e em 16 pacientes (21,6%) houve divergência dos resultados destas análises. Observamos, neste grupo, que 14 dos 74 (18,9%) pacientes analisados mostraram PDL-1 negativo no material da biópsia e positivo na peça cirúrgica e em 2 (2,7%) casos esta expressão foi positiva no material da biópsia e negativa na peça cirúrgica pós tratamento sistêmico. Dentre estes 14 casos, apenas dois apresentavam mais que uma amostra de áreas de peça cirúrgica no TMA.

Tabela 5 – Expressão de PD-L1 nas amostras tumorais pré e pós neoadjuvância e por pacientes totais e pareados

Variável	N	%
Expressão de PD-L1 nas amostras analisadas (n=293)		
Negativa	251	85,2%
Positiva	42	14,3%
Expressão de PDL-1 na amostras de biópsia (n=132)		
Negativa	117	88,9%
Positiva	15	11,3%
Expressão de PDL-1 em amostras de peças cirúrgicas (n=161)		
Negativa	134	83,3%
Positiva	27	16,7%
Expressão de PDL-1 por pacientes com ao menos uma amostra tumoral (biópsia e/ou peça cirúrgica) (n=155)		
Negativa	124	80,0%
Positiva	31	20,0%
Expressão de PDL-1 em pacientes com ambas as amostras (biópsia e peça cirúrgica) (n=74)*		
Biópsia negativa e peça negativa	56	75,7%
Biópsia negativa e peça positiva	14	18,9%
Biópsia positiva e peça negativa	2	2,7%
Biópsia positiva e peça positiva	2	2,7%

* p = 0,003 (Teste de McNemar)

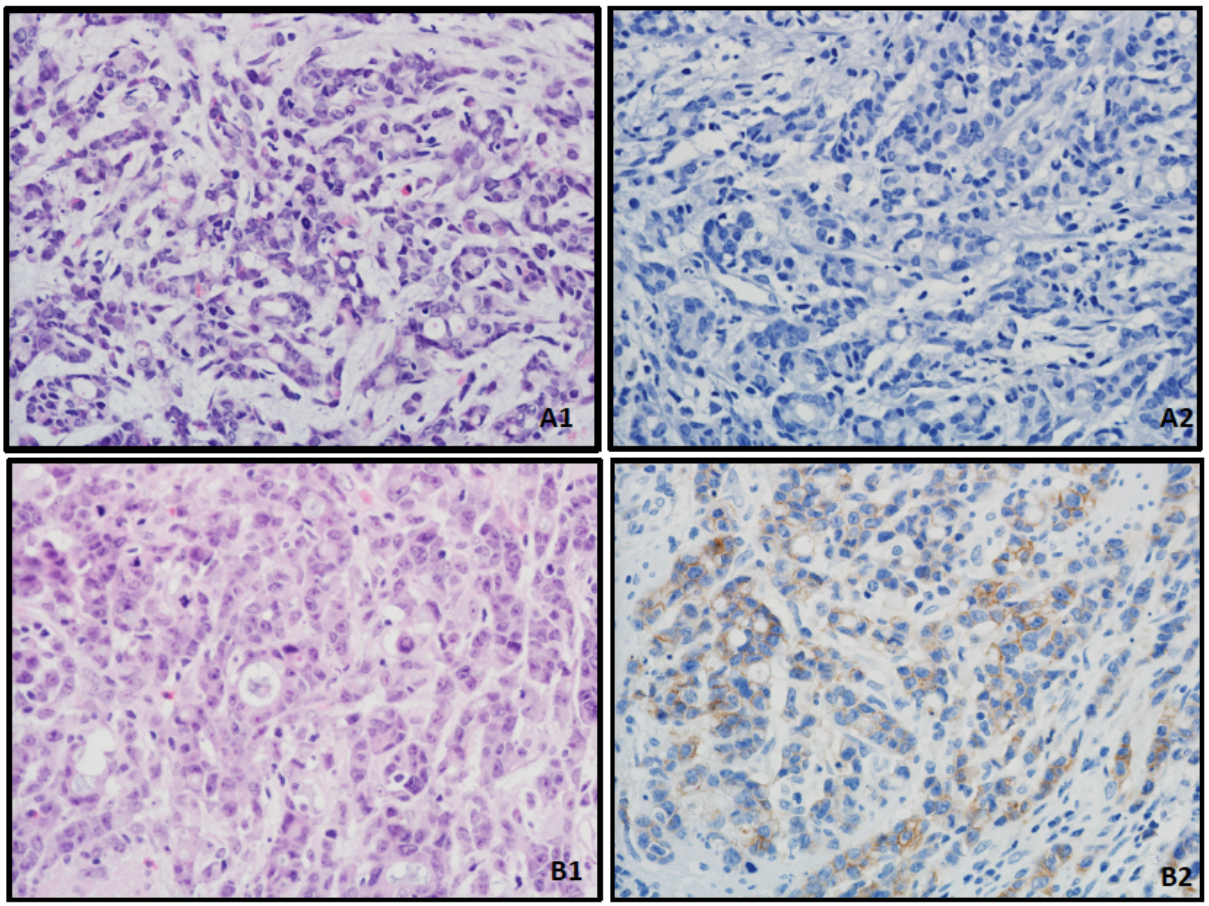


Figura 8 – Exemplo de caso discordante quanto à expressão do PD-L1: negativo na biópsia (A1 – HE, aumento original 40x; A2 – IHQ PD-L1 na biópsia, aumento original 40x) e positivo em peça cirúrgica (B1 – HE, aumento original 40x; B2 – IHQ PD-L1 no TMA – CPS 60, aumento original 40x).

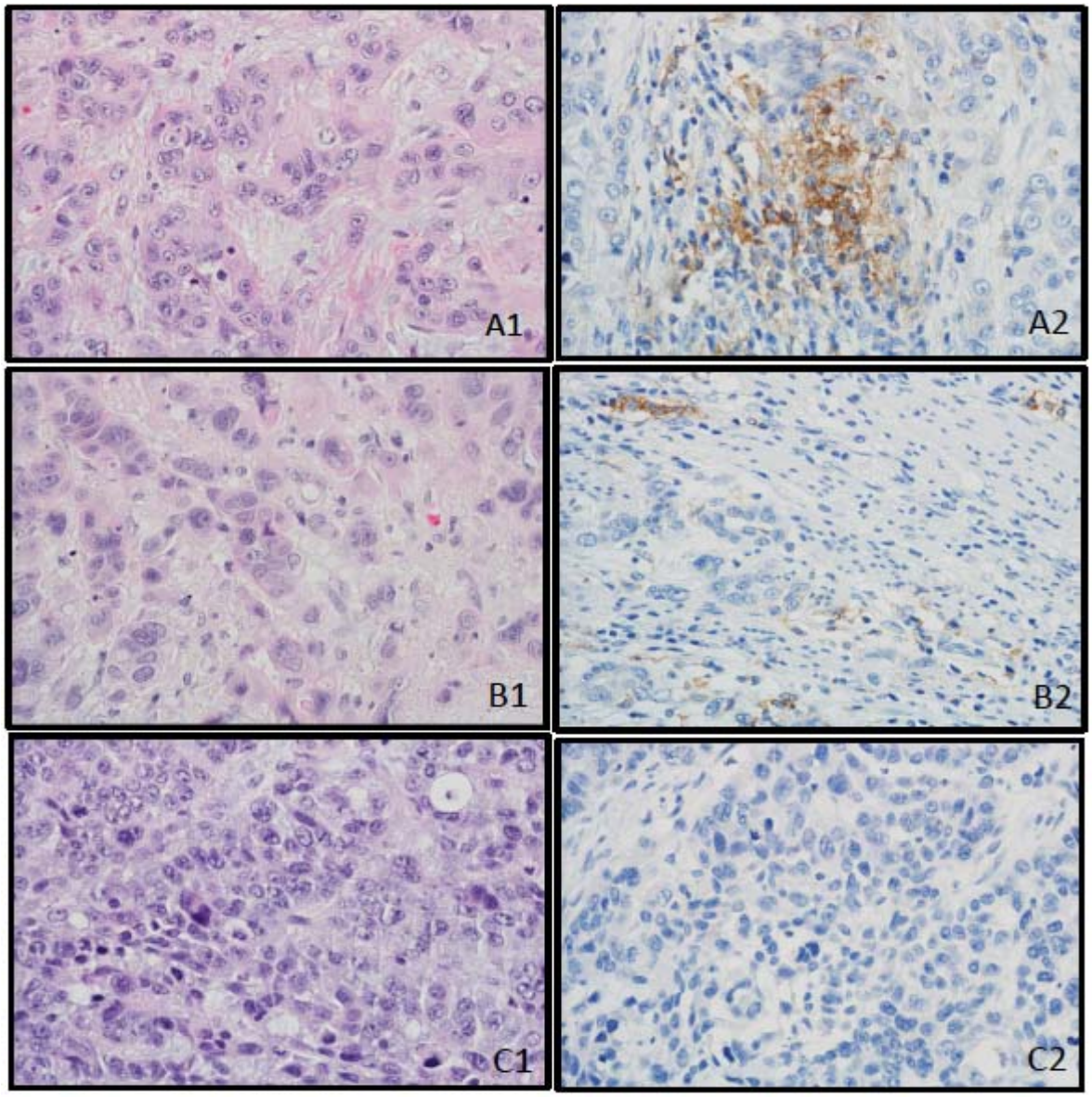


Figura 9 - Exemplo de heterogeneidade da expressão do PD-L1 em peça cirúrgica pós neoadjuvância. Caso 112. A: Bloco 1D – CPS positivo score 20 – A1 – HE (aumento original 40x); A2 – IHQ PD-L1 (aumento original 40x). B: Bloco 1E – CPS positivo score 10 – B1 – HE (aumento original 40x); B2 – IHQ PD-L1 (aumento original 40x). C: Bloco 1Q – CPS negativo – C1 – HE (aumento original 40x); C2 – IHQ PD-L1 (aumento original 40x).

A expressão imuno-histoquímica de PD-L1 mostrou associações estatísticas significantes com algumas variáveis clínicas e histopatológicas, como a idade do paciente, sendo a positividade deste marcador observada com mais frequência em pacientes mais idosos (média de idade 62,9 anos para os casos positivos versus 57,3 anos para os pacientes com expressão negativa, p=0,026); com os tumores do subtipo histológico intestinal, de acordo com classificação de Laurén (p=0,022), e com os tumores de localização proximal (p=0,030) (Tabela 6). De modo interessante, não houve correlação significante entre a expressão de PDL-1 e o estadiamento clínico pré-tratamento e patológico pós-neoadjuvância, grau de resposta patológica determinada pelo percentual de células tumorais viáveis, ou mesmo com o status de HER2. Também não se detectou qualquer impacto da expressão do PDL-1 de forma isolada nos resultados das taxas sobrevida tanto global (p=0,907) quanto livre de doença (p=0,686) (Figuras 10 e 11).

Tabela 6 - Correlação entre a expressão imuno-histoquímica de PDL-1 e as características clínicas e histopatológicas em 155 pacientes de câncer gástrico submetidos a tratamento neoadjuvante

Variável	**Expressão global de PD-L1**		**P**
	No. (%)		
	Negativa	**Positiva**	
Idade (media, dp)	57,3 (12,6)	62,9 (11,3)	0,026
Sexo			
Masculino	68 (54,8%)	19 (61,3%)	0,550
Feminino	56 (45,2%)	12 (38,7%	
Estádio Clínico			
cT1-2 N0	3 (2,4%)	2 (6,4%)	0,122
cT3-4 N0	43 (34,7%)	11 (35,5%)	
cT1-2 N+	14 (11,3%)	0 (0%)	
cT3-4 N+	64 (51,6%)	18 (58,1%)	
Histologia (n=151)			
Difuso	65 (53,3%)	8 (27,6%)	0,022
Intestinal	44 (36,1%)	18 (62,1%)	
Misto	13 (10,6%)	3 (10,3%)	
Localização			
Cárdia/fundo	19 (15,3%)	11 (35,5%)	0,030
Corpo	44 (35,5%)	11 (35,5%)	
Antro/piloro	61 (49,2%)	9 (29,0%)	
Estádio T			
ypT0-2	56 (45,2%)	12 (38,7%)	0,550
ypT3-4	68 (54,8%)	19 (61,3%)	
Estádio N			
ypN0	55 (44,4%)	16 (51,6%)	0,547
ypN+	69 (55,6%)	15 (48,4%)	
Percentagem de células viáveis			
0%	12 (9,7%)	3 (9,7%)	0,620
< 10%	7 (5,6%)	2 (6,4%)	
10% - 50%	43 (34,7%)	7 (22,6%)	
> 50%	62 (50,0%)	19 (61,3%)	
Expressão/amplificação de HER2 (n=139)			
Negativo	97 (87,4%)	23 (82,1%)	0,538
Positivo	14 (12,6%)	5 (17,9%)	

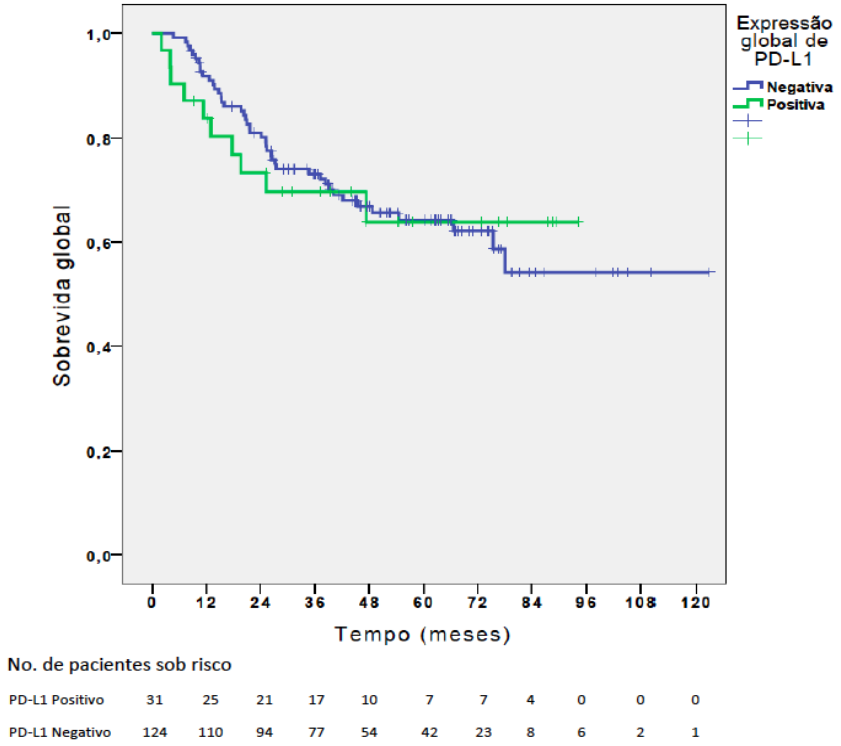


Figura 10 – Curva de Sobrevida Global segundo a expressão imuno-histoquimica de PD-L1(p=0,907)

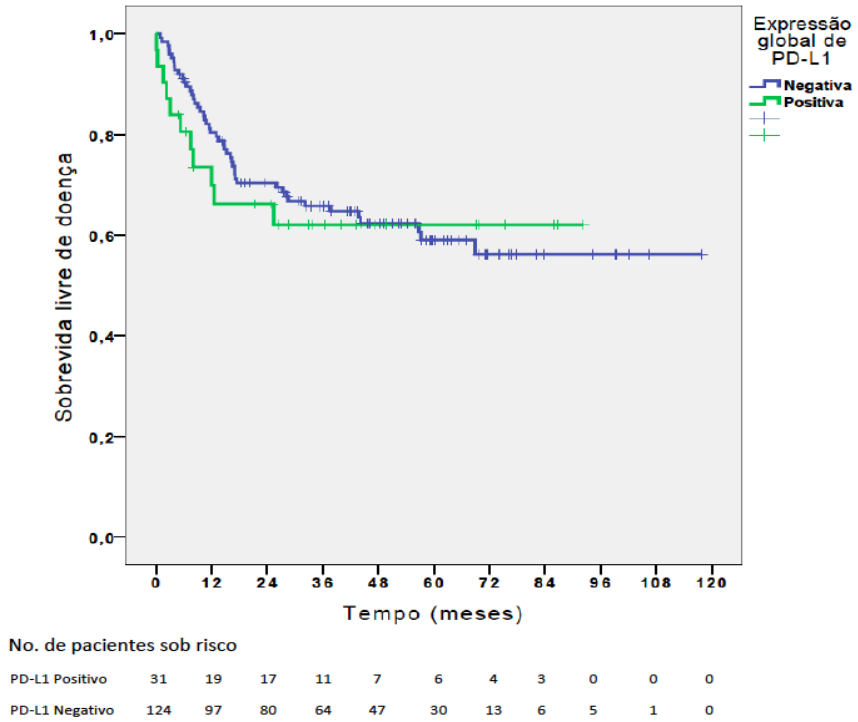


Figura 11 – Curva de Sobrevida Livre de Doença segundo a expressão imuno-histoquimica de PD-L1(p=0,686)

5.4 FATORES PROGNÓSTICOS DE SOBREVIDA

Por fim, com os dados da resposta patológica ao tratamento neoadjuvante e com a expressão do PD-L1, procedeu-se à análise de fatores prognósticos associados às taxas de sobrevida global (Tabela 7) e livre de doença (Tabela 8). Na análise univariada, o subtipo histológico intestinal e a percentagem de fibrose no leito tumoral (tomada como variável contínua) foram fatores significativamente associados as melhores taxas de sobrevida global e livre de doença. Por outro lado, a classificação de risco cirúrgico ASA 3-4, a necessidade de uma ressecção ampliada, o estadiamento patológico ypT3-4 e ypN+ e o percentual de células viáveis no leito tumoral entre 10 – 50% (HR 5,17) e acima de 50% (HR 10,29) se correlacionaram com um pior resultado em ambas as taxas de sobrevida.

Nas análises multivariadas para ambos os desfechos, apenas a variável relacionada ao estadiamento patológico pós-neoadjuvância (ypT3-4 e ypN+) manteve uma associação significativa com pior prognóstico nas taxas de sobrevida, enquanto o subtipo intestinal continuou relacionado a um melhor desfecho clínico. A expressão de PD-L1 não foi fator associado às taxas de sobrevida em ambas as análises e o grau de resposta patológica à neoadjuvância não se manteve como preditor nem de sobrevida global, nem de sobrevida livre de doença, na análise ajustada.

Tabela 7 – Análise uni e multivariada de fatores prognósticos de Sobrevida Global

Variável	**Análise univariada**			**Análise multivariada**		
	HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
Sexo masculino	1,02	(0,67 – 1,55)	0,926	-	-	-
Idade	1,01	(0,99 – 1,02)	0,484	-	-	-
ASA						
ASA 1-2	1,0			1,0		
ASA 3-4	1,58	(1,01 – 2,47)	0,043	1,31	(0,81 – 2,12)	0,273
Localização do tumor						
Cárdia / fundo	1,40	(0,81 – 2,43)	0,231	-	-	-
Corpo	0,95	(0,60 – 1,51)	0,822	-	-	-
Antro / piloro	1,0			-		
Estadio Clinico						
cT1/T2 N0	1,0			-		
cT3/T4 N0	1,22	(0,29 – 5,08)	0,787	-	-	-
cT1/T2 N+	0,58	(0,11 – 3,00)	0,519		-	-
cT3/T4 N+	1,46	(0,36 – 5,99)	0,600	-	-	-
Ressecção ampliada	2,38	(1,40 – 4,03)	0,001	1,48	(0,83 – 2,64)	0,181
Histologia						
Difuso	1,0			1,0		
Intestinal	0,61	(0,39 – 0,95)	0,030	0,56	(0,35 – 0,90)	0,017
Misto	0,56	(0,25 – 1,25)	0,157	0,50	(0,22 – 1,13)	0,096
Estádio T						
ypT0-1-2	1,0			1,0		
ypT3-4	5,66	(3,29 – 9,72)	< 0,001	2,93	(1,61 – 5,33)	<0,001
Estádio N						
ypN0	1,0			1,0		
ypN+	4,33	(2,67 – 7,00)	< 0.001	2,67	(1,54 – 4,63)	<0,001
Fibrose	0,98	(0,97 – 0,99)	<0,001	1,00	(0,99 – 1,02)	0,641
Percentagem de células viáveis						
0%	1,0			1,0		
< 10%	1,77	(0,25 – 12,62)	0,565	0,78	(0,10 – 5,89)	0,809
10% - 50%	5,17	(1,21 – 22,05)	0,026	1,46	(0,29 – 7,30)	0,646
> 50%	10,29	(2,52 – 42,02)	0,001	3,13	(0,43 – 22,66)	0,260
PD-L1 Positivo	1,04	(0,52 – 2,07)	0,907	-	-	-

Tabela 8 - Análise uni e multivariada de fatores prognósticos de Sobrevida Livre de Doença

Variável	**Análise univariada**			**Análise multivariada**		
	HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
Sexo masculino	1,07	(0,71 – 1,60)	0,742	-	-	-
Idade	1,01	(0,99 – 1,02)	0,363	-	-	-
ASA						
ASA 1-2	1,0			1,0		
ASA 3-4	1,61	(1,05 – 2,46)	0,029	1,29	(0,81 – 2,05)	0,278
Localização do tumor						
Cárdia / fundo	1,61	(0,96 – 2,70)	0,071	1,42	(0,78 – 2,62)	0,250
Corpo	0,96	(0,61 – 1,51)	0,864	0,99	(0,61 – 1,62)	0,983
Antro / piloro	1,0			-		
Estadio Clinico						
cT1/T2 N0	1,0			-		
cT3/T4 N0	1,37	(0,33 – 5,70)	0,662	-	-	-
cT1/T2 N+	0,68	(0,14 – 3,35)	0,633		-	-
cT3/T4 N+	1,47	(0,36 – 6,03)	0,593	-	-	-
Ressecção ampliada	2,59	(1,57 – 4,28)	<0,001	1,47	(0,82 – 2,64)	0,200
Histologia						
Difuso	1,0			1,0		
Intestinal	0,63	(0,41 – 0,98)	0,039	0,58	(0,36 – 0,93)	0,017
Misto	0,61	(0,29 – 1,28)	0,191	0,54	(0,25 – 1,16)	0,114
Estádio T						
ypT0-1-2	1,0			1,0		
ypT3-4	6,61	(3,86 – 11,32)	< 0,001	3,37	(1,84 – 6,14)	<0,001
Estádio N						
ypN0	1,0			1,0		
ypN+	4,7396	(2,96 – 7,56)	< 0.001	2,77	(1,62 – 4,72)	<0,001
Fibrose	0,98	(0,97 – 0,99)	<0,001	1,01	(0,99 – 1,02)	0,336
Percentagem de células viáveis						
0%	1,0			1,0		
< 10%	1,89	(0,27 – 13,45)	0,523	0,81	(0,11 – 6,18)	0,841
10% - 50%	5,82	(1,37 – 24,74)	0,017	1,79	(0,36 – 8,92)	0,477
> 50%	11,94	(2,93 – 48,71)	0,001	4,54	(0,63 – 32,46)	0,132
PD-L1 Positivo	1,14	(0,59 – 2,21)	0,687	-	-	-

6 DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISE DOS RESULTADOS GERAIS

O tratamento multimodal do câncer gástrico tem apresentado evoluções consistentes nas últimas décadas. Segundo os dados mais recentes, sobrevidas medianas de 50 meses puderam ser obtidas com quimioterapia perioperatória e cirurgia com técnicas padronizadas, em pacientes com doença locorregional (Al-Batran et al. 2019). Nesta coorte, atendidos os critérios de seleção, 270 casos puderam ser analisados, permitindo a avaliação dos resultados desta modalidade de tratamento em nosso meio. Importante salientar que, como o objetivo estava atrelado ao procedimento cirúrgico em si, os casos que iniciaram a neoadjuvância mas não chegaram a ser operados foram excluídos desta análise.

Quando se observa a caracterização desta amostra alguns dados chamam a atenção, incluindo o percentual de pacientes com tumores de tipo histológico difuso e de localização proximal no órgão, mais frequentes aqui que em outras séries da literatura e até em estudos randomizados (Böger et al. 2016; Al-Batran et al. 2019). Ao que parece, observa-se uma transição epidemiológica desta neoplasia, justamente com a redução dos casos do subtipo intestinal e uma queda menos marcante nos tumores proximais e do subtipo difuso (Bray et al. 2018). Outra correlação que pode ser estabelecida é entre este percentual e a idade mediana dos pacientes (58 anos), uma vez que justamente entre os mais jovens é que a incidência dos tumores difusos prepondera.

Na fase pré-operatória, o estadiamento clínico de quase a totalidade dos casos foi realizado com a tomografia computadorizada e um percentual expressivo dos pacientes foi submetido à laparoscopia exploradora, acrescentada de forma rotineira no protocolo de tratamento institucional após 2013 (Costa Jr et al. 2013). Poucos casos tiveram acesso à ecoendoscopia, considerado um teste de alta acurácia para a detecção do estadio T e N. Por outro lado, uma análise preliminar do uso institucional de um protocolo de distensão gástrica para estadiamento com a tomografia, introduzido mais frequentemente após 2015, aponta para uma acurácia de 78% para T3, 90% para T4 e 78% para N+ (Almeida et al. 2018).

Embora pacientes mais idosos tenham sido arrolados para o tratamento multimodal, a despeito de sua não representação nos estudos randomizados, tanto a mediana de idade quanto o fato de que mais de 75% dos casos foram classificados como ASA 1-2 denotam, nesta coorte,

uma seleção provavelmente atrelada à busca de melhores resultados em termos de morbimortalidade da associação do tratamento sistêmico com a cirurgia radical do câncer gástrico. Tradicionalmente, o câncer gástrico era considerado como um tumor quimio-resistente, disseminando entre os cirurgiões o conceito de que a quimioterapia pré-operatória poderia tirar do paciente as condições clínicas ideais para a realização do tratamento cirúrgico radical e de que o procedimento cirúrgico inicial seria a melhor opção de tratamento para esta neoplasia, mesmo no cenário metastático. A decisão multidepartamental do nosso serviço em desafiar este conceito logo após a publicação da evidência do benefício propiciado pela quimioterapia perioperatória em 2007, ainda que pesasse naquele momento, a dúvida sobre os esquemas ideais de quimioterapia, se deveu ao entendimento de que mesmo com a técnica cirúrgica padronizada, a melhoria de resultados das taxas de sobrevida destes casos passava pelo controle sistêmico da doença.

De fato, a evolução dos esquemas terapêuticos e a expertise dos profissionais na realização do tratamento, aliados ao suporte para manejo das possíveis complicações e à personalização da estratégia, permitiram que a maioria (87,8%) dos casos concluísse o tratamento pré-operatório proposto. A taxa de 41% de pacientes capazes de concluir todo o esquema quimioterápico planejado também vai de encontro com os dados da literatura, reforçando o impacto que o tratamento pré-operatório tem na chance de exposição do paciente à quimioterapia (Cunningham et al. 2006; Ychou et al 2011; Al-Batran et al. 2019), e, provavelmente, na melhora do desfecho de sobrevida apresentado.

Do ponto de vista técnico, pode-se considerar esta uma coorte homogênea no que diz respeito à padronização do procedimento cirúrgico. A mediana de linfonodos ressecados atesta a atenção a este quesito, em consonância com os *guidelines* japoneses (Japanese Gastric Cancer Association 2020). Outro dado que reflete este rigor é a baixa taxa de ressecções com margens comprometidas - cerca de 4% versus 15%, por exemplo, em estudo randomizado recente (Al-Batran et al. 2019). Este baixo percentual de margens comprometidas está associado, por sua vez, à conferência sistemática do status microscópico da margem de ressecção durante a cirurgia realizado na instituição e, também, a um número considerável de ressecções multiviscerais (11%), indicadas com o objetivo de se atingir uma cirurgia R0. Outro ponto importante no que diz respeito ao procedimento cirúrgico foi a definição da intenção do mesmo. Todos os casos desta coorte foram estadiados como cM0, ou seja, sem metástases à distância detectáveis no pré-operatório. Ao final do procedimento, 6,2% dos casos se revelaram pM1, com o achado de doença metastática durante a cirurgia e comprovada por biópsia de congelação ou no anátomo-patológico final. Estes, assim como os outros casos foram considerados

procedimentos com intenção curativa, no que pese o mau prognóstico que a presença de doença metastática representa e seus desfechos analisados em conjunto com os casos não metastáticos.

Talvez atrelado também à seleção dos pacientes, mas também à padronização dos cuidados perioperatórios, observou-se o que pode ser considerado um baixo percentual de complicações (32%) e de óbitos pós-operatórios (3,5%). Entendemos que estes números atestem a segurança deste protocolo de tratamento neste ambiente controlado e que poderiam embasar a decisão de se adotar o tratamento multimodal quando comparados com dados de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico primário (Ramos et al. 2018).

A análise patológica da peça cirúrgica revelou um percentual de casos sem doença residual de 13%, número comparável aos dados disponíveis de resposta patológica completa na literatura (Uson Junior et al. 2019). Também chama a atenção o fato de que a maioria dos casos foram considerados ypN0, em contraste com o achado de mais de 60% dos casos tidos como cN+. Este dado pode refletir duas justificativas, não necessariamente excludentes. A primeira diz respeito à acurácia do estadiamento clínico adotado, onde a maioria dos casos tidos como cN+ assim foram classificados baseados nos achados de tomografia. O critério adotado para este fim (tamanho, morfologia e aspecto radiológico dos gânglios) se mostrou com acurácia variável em outras publicações. Ainda assim, esta nos parece ser a ferramenta mais reprodutível e acessível para o estadiamento N, embora alguma variabilidade inter-observador não possa ser excluída (Kwee e Kwee 2009; Vergadis et al. 2018). A outra justificativa plausível é a possibilidade do recrudescimento do estadiamento da neoplasia devido à ação do tratamento neoajuvante, atestada por fato semelhante em vários outros estudos (Cunningham et al. 2006; Ychou et al 2011; Al-Batran et al. 2019). Este ponto poderia ser reforçado pelo achado que também mais casos foram estadiados como ypT1-2 quando comparados ao estadiamento clinico. No entanto, a ausência de análise pormenorizada dos achados patológicos linfonodais, no que pese este objetivo extrapolar o escopo desta tese, impede maiores conjecturas neste sentido. A avaliação de um possível impacto deste *downstaging* nos resultados de sobrevida será abordada em seção própria desta discussão.

6.2 RESPOSTA PATOLÓGICA E SOBREVIDA

Com um tempo de seguimento mediano de 60 meses, os resultados de sobrevida global e livre de recidiva em nossa coorte se alinham com os melhores já descritos em literatura com amostras semelhantes de casos, independentemente da estratégia de tratamento multimodal adotada (Noh et al. 2014; Hu et al 2019; Al-Batran et al. 2019). Conforme descrito, neste

período, 76 pacientes apresentaram recidivas e 85 foram a óbito, 16 deles por outras causas que não a doença oncológica, resultado em sobrevidas medianas não atingidas. Por outro lado, pode-se observar que este período de seguimento é superior ao reportado na maioria das séries, o que reforça a possibilidade de maior precisão desta estimativa.

Um ponto importante que pudemos avaliar foi a resposta patológica produzida pelo tratamento neoadjuvante e seu impacto na sobrevida. Embora vários sistemas estejam disponíveis na literatura optamos por utilizar a categorização proposta por Becker et al. (2003, 2011) e Langer e Becker (2018), uma vez que a mesma tem sido a mais utilizada em estudos randomizados, leva em conta o percentual de células viáveis residuais em relação à área tumoral e separa os casos em estratos mais reprodutíveis. Conforme discutimos anteriormente, 13% dos casos apresentaram um grau de regressão tumoral classificado como Grau 1a, ou seja, resposta patológica completa. Outros 34,1% dos casos apresentaram respostas Grau 1b e 2, produzindo uma taxa global de resposta patológica clinicamente significativa de 47,1%. Vários estudos analisaram o impacto deste achado em sobrevida e aqui também pudemos demonstrar uma associação entre resposta patológica e este desfecho em análise não controlada. De fato, a ausência de células tumorais residuais se associou a sobrevida câncer-específica de 100% em cinco anos nesta coorte. Resultados muito expressivos de sobrevida global também foram observados nos estratos seguintes, chamando a atenção que quanto maior o percentual de células residuais, menor a sobrevivência observada, atingindo a mediana de 60 meses para o grau 3 de resposta (acima de 50% de células tumorais viáveis).

Além de categorizar o resultado de sobrevida obtido, a análise do grau de regressão tumoral nos parece oferecer uma oportunidade concreta de seleção de pacientes para terapias adicionais ou sequenciais, uma vez que aqueles que não apresentaram resposta ao esquema oferecido significativamente derivam piores resultados de sobrevida e seriam candidatos ideais para ensaios clínicos. No entanto, tal como o ocorrido nesta coorte, tal dado não estabelece mudança de conduta na quimioterapia adjuvante até o presente momento, uma vez que os estudos foram desenhados considerando-se o tratamento como um todo e nenhum ajuste baseado em resposta foi previsto ou analisado.

Mas o achado mais relevante ao nosso ver nesta casuística, em consonância com estudo previamente publicado pelo grupo (Coimbra et al. 2019), é que, ao que parece, mais importante que o percentual de células tumorais viáveis seria a localização das mesmas na parede do órgão, traduzindo o estadio T patológico pós neoadjuvância (ypT). Assim, quando analisadas em conjunto, estas variáveis (grau de regressão tumoral e estadiamento patológico) se correlacionam e o segundo, e apenas este, se mantém como determinante da sobrevida

observada, conforme também já relato em outras coortes (Davies et al. 2014). Tal fato ainda não é completamente explicado, mas provavelmente se correlaciona com outros fatores tais como a maior chance de disseminação linfonodal e hematogênica em casos de tumores mais profundos na parede gástrica (ypT3 e ypT4) mesmo que uma quantidade mínima de células permaneça viáveis nestas camadas (Zhu et al. 2017).

6.3 A EXPRESSÃO PROTEICA DE PD-L1 E A HETEROGENEIDADE INTRA-TUMORAL

Conforme descrito na seção de resultados, a análise da expressão proteica do PD-L1 foi feita em um pouco mais da metade dos casos e demonstrou um percentual geral de positividade em 20% dos pacientes que dispunham de ao menos uma amostra tumoral para ser analisada. Considerando-se as amostras, esta taxa atingiu 11,3% levando-se em consideração somente as amostras pré neoadjuvância e 16,9% no material obtido após este tratamento. Este resultado ficou, em geral, aquém do relatado na literatura internacional tanto para séries de casos (Böger et al. 2017; Yamashita et al. 2020) quanto para os estudos randomizados (Fuchs et al. 2018) e em consonância com casuística nacional publicada recentemente (Pereira et al. 2018), no que pese diferenças metodológicas importantes. De modo concreto, taxas de positividade de 8 a 69% têm sido relatadas, a depender das amostras analisadas, do parâmetro de determinação da positividade, do anticorpo empregado e do estadiamento da doença. Até o momento, poucos estudos correlacionaram esta expressão com a realização de tratamento sistêmico prévio, especialmente em pacientes com doença não metastática (Yu et al. 2019; Schoop et al. 2020).

Nesta coorte, utilizamos o anticorpo 22c3 PharmDX com o mesmo teste descrito e aprovado pelas agências reguladoras para a utilização da terapia anti-PD1 no cenário clinico de câncer gástrico e de TEG metastático e com a mesma metodologia de expressão, qual seja o *Combined Positive Score* ou CPS. No estudo que demonstrou o benefício do Pembrolizumabe em terceiras ou mais linhas de tratamento (KEYNOTE-059), a taxa de positividade para a expressão do PD-L1 foi de 57,1%. Esta análise foi feita majoritariamente em biópsias de tumores primários (52,8%) e apenas em 18.1% das vezes em peças cirúrgicas de casos previamente operados e em 27,4% em biópsias de sítios metastáticos (Fuchs et al. 2018).

Outras coortes relataram diferentes taxas de positividade do PD-L1, baseadas em sua maioria em metodologias distintas do CPS. Em 2015, um grupo Chinês reportou a expressão do PD-L1 em amostras obtidas de peças cirúrgicas de pacientes com adenocarcinoma gástrico submetidos a tratamento cirúrgico *upfront.* Utilizando-se um anticorpo diferente (ab58810 –

Abcam, 1:50) e considerando positivos apenas os casos com coloração citoplasmática moderada a intensa das células tumorais, eles detectaram uma taxa de expressão de 50,8%. Neste estudo não foi levado em consideração a expressão em células imunes e nenhum escore de proporcionalidade foi utilizado (Zhang et al. 2015).

Já em 2017, autores alemães publicaram uma grande casuística incluindo 465 casos submetidos também a tratamento cirúrgico como abordagem primária da neoplasia gástrica sendo que um percentual importante deles (20%) apresentavam-se já em estadio IV. Neste estudo a expressão do PD-L1 foi acessada por imuno-histoquimica com o anticorpo E1L3N *Cell signaling* e os resultados computados levando-se em conta a marcação em células tumorais, do estroma e imunes em separado. Para a expressão nas células tumorais foi considerada apenas a coloração de membrana, tal como nos protocolos mais recentes incluindo o *CPS*. O percentual de células com expressão e a intensidade da mesma foram utilizadas para a construção de um escore de imunorreatividade e uma taxa de positividade neste grupo de células de 30,1% pôde ser observada. Já 35,5% dos casos demonstravam positividade da expressão do PD-L1 nas células imunes (Böger et al. 2017).

Algumas meta-analises foram produzidas endereçando a taxa de expressão e o impacto da positividade do PD-L1 no prognóstico de pacientes com adenocarcinoma gástrico. Em relação à expressão, a compilação mais recente incluiu 15 estudos e 3291 pacientes e reportou as taxas de 14,3 a 69,3% citadas previamente. Esta variabilidade foi atribuída novamente às diferenças de anticorpos empregados e também a diferentes valores de pontos de corte para se determinar a positividade (>1%, > 5%, > 10% e > 50%) (Gu et al. 2017). Esta heterogeneidade dificulta sobremaneira a compreensão destes dados e sua reprodutibilidade. Conforme já colocado antes, sem uma padronização destas análises inclusive nos estudos de validação da utilização dos inibidores de *chekpoint* imunes, é bastante provável que sigamos tendo resultados contraditórios e dificilmente avançaremos na seleção dos casos mais propensos a responderem a estas terapias.

Mais recentemente, um estudo nacional incluiu pacientes com câncer gástrico sendo que 11,% foram submetidos a tratamento neoadjuvante e detectou uma taxa de positividade para a expressão do PD-L1 de apenas 8,8% considerando-se a marcação de membrana em células neoplásicas e/ou células imunes intra-tumorais. A imuno-histoquimica foi realizada em um tissue microarray (TMA) construído com amostras obtidas das peças cirúrgicas. Estes pesquisadores utilizaram o anticorpo anti-PD-L1 da Abcam e consideraram o cut-off de positividade de 1%, mas sem descrever exatamente se a análise fora feita pelo CPS (Pereira et al. 2018).

Outro ponto chave nesta variabilidade das taxas de expressão se assenta na análise ou não do infiltrado inflamatório intra e peri-tumoral. Em nossa coorte, tal como descrito na metodologia do *Combined Positive Score*, tais células foram contabilizadas no numerador do escore quando marcadas com o anticorpo anti-PD-L1 (Agilent Dako 2020). Esta diferença nos remete aos conceitos do CPS e do Tumor Positive Score (TPS), discutidos na introdução. Basicamente, pelo TPS somente serão considerados positivos casos que apresentem expressão membranosa do PD-L1 em células tumorais. Já pelo CPS, qualquer amostra que contenha ao menos 100 células tumorais viáveis e em que haja coloração de membrana em alguma destas células e de membrana ou citoplasma em células imunes relacionadas à neoplasia pode ser considerada positiva se resultar num escore acima de 1.

Em 2020, Yamashita et al. reportaram os resultados de uma análise comparativa destas duas ferramentas em 191 pacientes com câncer gástrico não metastático e sem tratamento neoadjuvante, utilizando um anticorpo específico (anti-Iba-1) para a identificação das células imunes intra-tumorais. Embora com um anticorpo diferente do aprovado pelo teste do FDA para identificar pacientes potenciais beneficiários da terapia anti-PD1, neste estudo a análise da expressão do PD-L1 se assemelhou muito à realizada em nossa coorte. Os pesquisadores identificaram uma taxa de positividade de 20,4% pelo TPS e 71,7% pelo CPS, demonstrando que a inclusão das células imunes na análise amplia muito o número de casos considerados PD-L1 positivos. Este parece ser um dos estudos mais detalhados a respeito desta expressão e, novamente, taxas bem superiores às descritas nas casuísticas nacionais foram reportadas. Tal discrepância pode estar relacionada ao fato de a análise da expressão ter incluído, aqui, peças cirúrgicas pós neoadjuvância, uma possível baixa representatividade das amostras de biópsias e o uso do TMA na avaliação. Outro fator difícil de ser caracterizado neste cenário seria alguma possível variabilidade geográfica nesta expressão, eventualmente associada a fatores regionais e à ancestralidade, vistas taxas tão discrepantes em várias partes do mundo.

Até onde sabemos, nossa casuística é uma das únicas coortes na literatura a analisar a expressão do PD-L1 em amostras pareadas de adenocarcinomas gástricos e de junção gastro-esofágica antes e após o tratamento neoadjuvante. Por diversos fatores, entre eles a reestruturação do setor de anatomia patológica e o direcionamento de exemplares de biópsias e peças cirúrgicas para exames complementares solicitados na rotina clínica e/ou para outros estudos em vigência na instituição, um número baixo de amostras pareadas pôde ser obtido. Ainda assim, os resultados são intrigantes. A taxa de positividade da expressão do PD-L1 nas biópsias (11,3%) se assemelhou muito à outra casuística nacional onde a maioria dos casos foram analisados sem a exposição à quimioterapia neoadjuvante, ambas bem abaixo do

reportado em outras séries tanto com pacientes com doença localizada quanto com casos mais avançados (Pereira et al. 2018). Considerando-se as amostras das peças cirúrgicas, a taxa de positividade chegou a 16,7%.

A realização da análise das peças em TMA poderia ser apontada como uma justificativa para esta baixa expressão, alicerçada na menor representatividade da neoplasia que esta técnica traz. De modo semelhante, nesta outra casuística nacional citada acima esta mesma metodologia foi empregada. De fato, a maioria das séries reportadas analisaram a expressão em lâminas convencionais extraídas dos blocos de parafina. Embora esta comparação esteja indisponível na literatura para casos de câncer gástrico, em outros sítios neoplásicos a heterogeneidade intratumoral da expressão do PD-L1 tem sido investigada e comparações entre amostras convencionais e em *cores* representados em TMAs foram feitas. Em nossa série, considerando-se o critério de disponibilidade de amostras e de seleção de áreas da neoplasia mais representativas, 54% dos pacientes com material disponível pós-neoadjuvância foram representados por apenas uma amostra, 27,8% por duas e o restante por 3 a 5 amostras. Embora tenhamos detectado heterogeneidade em amostras do mesmo paciente tal como representado na figura 9, o fato de ser representado em mais de uma amostra não pareceu influenciar na positividade dos casos pós-neoadjuvância.

Em 2017, Li et al reportaram uma taxa de discrepância de 18,9% entre a expressão do PD-L1 pelo TPS quando comparadas amostras convencionais obtidas de blocos das peças cirúrgicas e TMA confeccionado com estes mesmos espécimes em câncer de pulmão, sendo que as primeiras estavam mais comumente positivas. Apesar deste dado, outras casuísticas de câncer gástrico com expressão de PD-L1 mais frequente que os dados aqui apresentados se basearam na análise de TMAs (Kim JW et al. 2016; Patil et al. 2018), deixando esta questão em aberto. Além disso, a análise prévia das lâminas de HE com cortes dos blocos das peças cirúrgicas para a seleção das áreas mais representativas da neoplasia a serem incluídas no TMA teoricamente corrigiria esta deficiência de amostragem, além de excluir os casos com resposta completa que, em importante idiossincrasia técnica do CPS, não podem ser analisados por esta metodologia. Uma proposta de sequência deste estudo e que pode esclarecer esta dúvida seria a análise comparativa dos casos negativos no TMA com a avaliação da imuno-histoquimica em lâminas convencionais, a ser levado a cabo como linha de pesquisa departamental neste tópico. Por ora, somos levados a crer que nossos números são críveis e embasam as análises aqui tecidas.

Além do percentual de positividade do PD-L1, a taxa de discordância da expressão entre as amostras de biópsias e de peças na coorte pareada chamou nossa atenção (21,6% de

resultados divergentes incluindo 18,9% de casos em que o material testou negativo para a expressão do PD-L1 na biópsia e positivo no TMA pós neoadjuvância) e aqui há interessantes considerações a serem feitas.

A hipótese da escassez de material no TMA não se encaixaria nesta explicação visto que justamente um percentual significativamente maior de casos foi positivo nesta amostragem. O contrário também nos parece improvável: nenhum caso de biopsia foi descartado da análise por insuficiência de material tumoral conforme as especificações do teste (mínimo de 100 células tumorais amostradas) embora tenha sido relativamente comum que a neoplasia fosse representada em apenas 1 ou 2 fragmentos. A pouca representatividade tumoral em amostras de biópsias já foi reportado como causa de falha na análise de outras características moleculares em diversas neoplasias, sendo a pesquisa da hiperexpressão do HER2 o exemplo que perfeitamente se encaixa aqui. Há na literatura um certo conflito a respeito da concordância desta expressão em biópsias e em espécimes cirúrgicos, mas em geral taxas de similaridade acima de 90% são reportadas e um número mínimo de quatro fragmentos tumorais na biópsia é recomendado (Abrahao-Machado e Scapulatempo-Neto 2016).

Outros dois pontos se adicionam à esta discussão. O primeiro diz respeito ao papel da heterogeneidade da expressão do PD-L1 em câncer gástrico. Alguns autores demonstraram este achado e padronizou-se que diante de escores discordantes entre diferentes áreas da neoplasia o maior seria considerado. Assim, nossos casos discordantes (PD-L1 negativo na biópsia e positivo na peça) foram incluídos entre os positivos na análise geral de expressão. Também detectamos esta heterogeneidade em casos representados em mais de uma área no TMA conforme descrevemos na Figura 9. Em casos assim, o modo como a neoplasia se comportaria na eventualidade de um tratamento com algum inibidor de *checkpoint* é definitivamente algo que merece investigação adicional.

Dentro ainda deste conceito da heterogeneidade, vale ressaltar os achados da série alemã citada anteriormente. Neste estudo, os autores avaliaram a área tumoral onde a expressão do PD-L1 foi positiva e a mesma estava localizada no centro da neoplasia ou no front de invasão em 33% dos casos, o que a tornava provavelmente inacessível à biópsia (Böger et al. 2017). Tal achado propõe uma explicação para nossos dados, qual seja a de que, como procuramos incluir as áreas mais representativas da neoplasia no TMA, talvez tenhamos o construído mais frequentemente com as áreas descritas naquele estudo. Infelizmente, dado o caráter retrospectivo da nossa análise, não pudemos confirmar este achado. Mas esta constatação e o nosso resultado ascendem um alerta para a possibilidade de que a análise da expressão do PD-L1 apenas em biópsias obtidas por endoscopia do tumor primário pode trazer um resultado falso

negativo. Isso carrega especial importância nos estudos em que algum uso neoadjuvante da terapia anti-PD1 seja cogitado, mas, mais significativamente, nos casos metastáticos em que este dado será tomado como definidor da indicação (e do acesso) ou não à esta opção terapêutica.

O segundo ponto digno de nota aqui é a possibilidade de que a divergência de positividade de expressão do PD-L1 nestes casos estivesse relacionada não à questões pré-analíticas ou de adequação da amostra, mas sim à exposição à quimioterapia neoadjuvante. A ausência de um braço controle construído com as análises em biópsias e peças cirúrgicas de pacientes tratados com cirurgia *upfront* dificulta qualquer conjectura neste sentido, e esta também será uma das linhas de pesquisa que o desdobramento desta tese trará.

Duas séries na literatura lançaram luz sobre este tema. A primeira publicada por Yu et al. em 2019 comparou amostras pareadas de biópsias pré-neoadjuvância e peças cirúrgicas pós quimioterapia em 60 pacientes. Utilizando-se de anticorpo e metodologia para determinar a expressão diferentes da coorte aqui apresentada, estes autores detectaram um aumento do percentual de expressão não só do PD-L1 mas também de outros marcadores associados à resposta imune tumoral incluindo o PD1, TIM3 (*T-cell immunoglobulin and mucin domain 3*) e o infiltrado inflamatório peri-tumoral constituído por linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$. Numa elaboração interessante, estes autores hipotetizaram que tais achados poderiam esta relacionados a uma alteração em cascata do microambiente tumoral. Primeiramente a resposta ao tratamento neoadjuvante levaria à uma maior infiltração da neoplasia por células imunes dentre elas linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$. No entanto, seguindo-se à essa maior resposta imune, teria lugar uma maior expressão do PD-L1 induzida por interferon-γ secretado por linfócitos T ativados como um contra-balanceamento deste processo. Não fica claro na publicação qual o percentual de expressão do PD-L1 antes e após a quimioterapia nem a correlação com fatores clinico-patológicos. Eles, porém, relatam não ter havido impacto da resposta à terapia neoadjuvante na expressão destes marcadores e ainda que a maior expressão do PD-L1 pré neoadjuvância esteve associada a piores resultados de sobrevida (Yu et al. 2019).

Outra série, mais recente ainda, detectou resultado até certo ponto diferente. Analisando apenas as peças após a neoadjuvancia e comparando com uma outra coorte de pacientes submetidos a cirurgia *upfront* (portanto uma análise não pareada), estes pesquisadores avaliaram as alterações no infiltrado inflamatório bem como a expressão do PD1, PD-L1 e do VISTA (*V-Domain IG Supressor of T-cell Activation*), um outro membro da família B7 mais recentemente implicado no balanço regulatório da imunidade anti-neoplásica. Os resultados apontaram para um aumento da densidade de células imunes peri e intra-tumorais e da

expressão do PD1 e do VISTA após o tratamento quimioterápico, ao passo em que uma redução da expressão do PD-L1 pôde ser detectada. Nesta série, apenas 15,1% dos casos pós-neoadjuvância foram considerados PD-L1 positivos contra 23,9% daqueles sem a terapia sistêmica prévia. Estes autores postularam ainda que o tratamento neoadjuvante seria responsável por uma modificação no microambiente imune tumoral e que esta alteração poderia influenciar na expressão de proteínas de checkpoint. A destruição celular provocada pelo tratamento pré-operatório levaria a uma redução da antigenicidade da neoplasia e uma consequente redução na expressão de PD-L1. De modo interessante a expressão do VISTA se correlacionou negativamente com resposta ao tratamento neoadjuvante medida pelo grau de regressão tumoral de Becker (Schoop et al. 2020).

Portanto, no que diz respeito à expressão do PD-L1 nesta população bem como à mudança do percentual de positividade das amostras pré e pós neoadjuvancia entendemos que nossa casuística lança mais dados em um cenário ainda de resultados contraditórios na literatura e que deve levar mais algum tempo e exigir mais estudos, idealmente colaborativos, para uma melhor caracterização destas variáveis.

6.4 FATORES CLINICO-PATOLÓGICOS ASSOCIADOS À EXPRESSÃO DO PD-L1

Outra análise que pudemos fazer foi a de que fatores estiveram significativamente correlacionados à positividade de expressão do PD-L1 pelo CPS. Parte dos esforços recentes dos pesquisadores nesta área tem sido dedicada à caracterização do grupo de pacientes mais propenso a melhores respostas com o tratamento com os inibidores de checkpoint imunes, o que torna estas correlações bastante válidas. Utilizamos, aqui, os dados clínicos e patológicos já disponíveis, o que justifica a falta de análises adicionais tais como do status da instabilidade de microssatélites ou de outros marcadores de caracterização molecular do câncer gástrico como a hibridização para EBV.

Nossos casos PD-L1 positivos apresentaram uma mediana de idade acima daqueles que foram negativos e este achado também aparece em outras séries, sem uma explicação mais convincente. Na análise post hoc do CLASSIC trial, os pesquisadores observaram que a expressão do PD-L1 este associada à idade, sendo mais frequente em pacientes mais idosos e apenas na análise das células imunes intra-tumorais mas não nas células da neoplasia em si (Choi et al. 2019). Já Yamashita et al. (2020) estabeleceram uma correlação desta expressão

com idade acima de 65 anos. Por outro lado, tanto na casuística nacional já avaliada (Pereira et al. 2018) quanto na série alemã (Böger et al. 2017) e na meta-análise mais recentemente publicada (Gu et al. 2017) não houve correlação entre a idade e a expressão do PD-L1.

Outros fatores que se associaram à esta positividade foram a localização proximal da neoplasia, incluindo cárdia e fundo ante ao antro e a diferenciação histológica intestinal pela classificação de Laurén. Seguindo na linha das contradições de dados já publicados, estes achados foram confirmados em algumas séries e negados em outras. A localização aparece tal como encontrada aqui na série de Böger et al. (2017) e sem correlação com a expressão do PD-L1 nas demais séries incluindo a meta-análise citada (Zhang et al. 2015; Gu et al. 2017; Pereira et al. 2018; Choi et al. 2019; Yamashita et al. 2020). De modo interessante e fazendo um paralelo que infelizmente não pudemos traçar aqui pela indisponibilidade dos dados de MSI, na análise do CLASSIC TRIAL demonstrou-se que os tumores de antro apresentam mais frequentemente o perfil de Instabilidade de Microssatélites mas não foi observada diferença na expressão do PD-L1 considerando-se as regiões do órgão afetadas pela neoplasia, embora supostamente estas duas características estejam também correlacionadas (tumores com MSI apresentam maior expressão do PD-L1) (Choi et al. 2019).

Já sobre o subtipo de Laurén, tumores intestinais estiveram mais associados à positividade do PD-L1 apenas nas células imunes na análise dos pacientes do CLASSIC TRIAL, mas não à esta expressão nas células tumorais (Choi et al. 2019). Na série de Pereira et al. (2018) esta correlação se deu com o subtipo misto e na série de BÖRGER et al. (2017) a expressão do PD-L1 foi mais frequente nos casos considerados inclassificáveis e que corresponderam a 10% da casuística.

Algumas variáveis já associadas em outras publicações à expressão do PD-L1 não demonstraram a mesma característica em nossa série, incluindo o estadiamento clínico e patológico e a hiperexpressão do HER2. Uma das explicações possíveis para a baixa taxa de positividade da expressão de PD-L1 em nossa coorte em contraste com as séries de pacientes metastáticos e os estudos randomizados neste cenário poderia ser o achado de que esta expressão aumentasse com o avanço da doença. Em 2015 o grupo japonês da Universidade de Osaka publicou a série daquela instituição analisando a expressão do PD-L1 em 431 pacientes submetidos a tratamento cirúrgico upfront. Seus resultados apontavam neste sentido, com uma maior taxa de expressão citoplasmática intensa do PD-L1 em pacientes com estadios III e IV (50%) aquando comparados aos estadios I/II (18%) (Tamura et al. 2015). Na série de BÖRGER et al. (2017) os pesquisadores evidenciaram um aumento desta expressão à medida que o paciente apresentava lesões mais profundas na parede do órgão, mas apenas nos tumores

iniciais (T1a → T2). Daí em diante, porém, a expressão cai em frequência, desconstruindo o argumento de sua correlação com a progressão tumoral. Nesta série, assim como na nossa, não houve correlação da expressão com o estadiamento linfonodal e nem com o TNM clínico ou patológico.

Uma das meta-análises publicadas neste tema identificava uma associação do tamanho (>5cm) e da presença de metástases linfonodais com uma maior expressão desta proteína (Zhang et al. 2016). Na mais recente publicação deste tipo, nem o tamanho da neoplasia e nem o estadiamento TNM agrupado se correlacionaram com a expressão do PD-L1, a qual esteve associada ao estadio T e N (maior em tumores mais profundos e com metastases linfonodais), invasão vascular sanguínea e tumores EBV+ e MSI (Gu et al. 2017).

Sobre a correlação com o status do HER2, resultados contraditórios também marcam as evidências já publicadas e, em nossa série, nenhuma correlação foi detectada. Como a investigação da hiperexpressão desta proteína é mais comumente realizada no cenário de doença metastática, são escassos os dados que a correlacionem com o status do PD-L1 em pacientes semelhantes ao desta coorte. Em BÖRGHER et al. (2017) que incluiu quase 20% de pacientes em estadio IV, 8,5% de casos apresentavam HER2 positivo. Dentre estes, a taxa de positividade do PD-L1 foi de 48,6% ante 22,5% dentre os HER2 negativos. Por outro lado, em 2018, um grupo chinês publicou uma interessante análise da correlação entre a expressão do PD-L1, a deficiência na expressão dos genes de reparo e o status do HER2 em casos de tumores localizados sem quimioterapia neoadjuvante. Naquela casuística a expressão do PD-L1 foi significativamente mais frequente no grupo HER2 negativo que no positivo (39,0 versus 24,2%) (Wang et al. 2018). Já na última série em que encontramos este dado, uma associação da expressão do PD-L1 com HER2+ ocorreu apenas em pacientes não expostos à quimioterapia neoadjuvante, embora o estudo tenha contado com um pequeno número de casos neste grupo (Schoop et al. 2020). Assim, tal correlação se configura como mais um ponto aberto nesta discussão, sobre o qual temos a intenção de nos debruçarmos mais profundamente no futuro.

6.5 FATORES PROGNÓSTICOS DE SOBREVIDA – (AUSÊNCIA DE) O IMPACTO DA EXPRESSÃO DO PD-L1 NOS DESFECHOS CLINICOS

Deixamos para avaliar os fatores prognósticos relacionados aos desfechos clínicos após as análises sobre resposta patológica à terapia neoadjuvante e os dados sobre a expressão do PD-L1, cujo impacto aqui compõe nosso objetivo principal, de propósito.

Em relação à categorização da resposta patológica proposta por Becker, conforme discutimos anteriormente, pudemos detectar uma clara distinção de extratos prognósticos em análise não ajustada. Na análise multivariada, no entanto, esta variável não manteve seu valor preditivo de desfecho. Este tem sido um tópico de importante debate na literatura e já o abordamos na seção dedicada à esta relação nesta discussão. Mas o que nos chamou mais atenção é que em nossa casuística a expressão do PD-L1 não apresentou qualquer impacto nos resultados de sobrevida, nem global e nem livre de doença.

As primeiras análises sobre se e como a expressão do PD-L1 influenciaria nos resultados de sobrevida foram feitas de forma conjunta considerando-se diversos tumores sólidos. Assim, em 2015 uma meta-análise compilou os dados de diversos estudos que investigaram este impacto e concluiu que a expressão proteica do PD-L1 estava associada a piores desfechos de sobrevida global em 3 (OR = 2.43, 95% CI 1.60 – 3.70, $p < 0,0001$) e 5 anos (OR = 2.23, 95% CI 1.40 – 3.45, $p < 0,008$), sendo estes resultados independentes da metodologia adotada para a análise do PD-L1 incluindo anticorpos específicos e diferentes cut-offs para a caracterização da positividade. Nesta meta-analise foram incluídos 3 estudos de pacientes com câncer gástrico, produzindo um OR de 3.84 mas com um número limitado de casos (Wu et al. 2015).

A seguir esta associação foi investigada nas séries mais numerosas aqui já citadas. De forma importante e contraditória, observa-se resultados basicamente conflitantes entre estudos exclusivamente com pacientes orientais, estudos com casuística mista e séries de pacientes ocidentais, antecipando-se aqui um ponto que gostaríamos de discutir.

Entre 2014 e 2016 é possível se encontrar cinco séries publicadas sobre a incidência da expressão do PD-L1 em câncer gástrico em pacientes asiáticos e seu impacto em sobrevida. Em comum estas séries trouxeram dados com diferentes amostragens, algumas incluindo tecido não tumoral e de pacientes não metastáticos e sem tratamento neoadjuvante (HOU et al. 2014; JIANG et al. 2014; Qing et al. 2015; Zhang et al. 2015; ETO et al. 2016). Uma das mais importante destas séries é a de Zhang et al. (2015). Usando uma coorte de 132 pacientes chineses submetidos à ressecção cirúrgica *upfront*, estes autores obtiveram uma taxa de 50,8% de positividade para o PD-L1 e um resultado de sobrevida em cinco anos significativamente menor quando comparados casos PD-L1 negativos e positivos (SG em 5 anos: 83,1% versus 50,8% respectivamente, $p < 0,001$). Em análise ajustada, apenas a expressão do PD-L1 e a presença de metástases linfonodais se mantiveram como fatores prognósticos adversos em relação à sobrevida global.

Em contrapartida, a série alemã já bastante referida aqui trouxe dados de 465 casos de pacientes caucasianos com tumores de transição esôfago-gástrica e estômago, também

submetidos a tratamento cirúrgico primário, mas com quase 20% de casos metastáticos ao diagnóstico. Nesta coorte houve uma diferenciação entre a expressão do PD-L1 em células tumorais (30,1% de positividade) e células imunes peri e intra-tumorais (88,4% de casos considerados positivos). De fato estes autores demonstraram haver um impacto positivo da expressão do PD-L1 em sobrevida global mas apenas quando esta expressão ocorria nas células imunes (HR = 0.594, CI 0.461 – 0.765, p < 0,0001) (Böger et al. 2017).

A seguir, duas meta-análises vieram a público compilando dados de séries tanto do oriente quanto no ocidente. A primeira, publicada em 2016 incluiu 10 estudos, todos exceto um realizados em pacientes asiáticos. O estudo com pacientes ocidentais desta meta-análise é justamente a série alemã referida acima. Os dados compilados apontaram para a expressão do PD-L1 como fator prognóstico adverso para sobrevida global com HR 1.64, 95% CI 1.11 – 2.43, p < 0.01. De modo interessante este estudo reforçou a correlação deste efeito deletério com escores de positividade do PD-L1 com um aumento do risco de morte à medida que cut-offs acima de 10% e de 50% eram analisados (Zhang et al. 2016). A segunda meta-análise sobre este tema foi levada a cabo para incluir os estudos publicados entre 2016 e 2017 além daqueles sistematizados na análise prévia e ainda assim incluiu apenas uma (a mesma) série ocidental. Com isso o número de pacientes arrolados chegou a 3291 e o efeito deletério da expressão do PD-L1 caiu de um aumento de risco de morte de 64% descrito na primeira meta-análise para 46%, ainda assim significativo (Gu et al. 2017).

Segundo estes pesquisadores, algumas justificativas podem ser apontadas para este achado. A primeira é a de que a expressão do PD-L1 traduz um acionamento do eixo de inibição imune PD1/PD-L1induzindo a apoptose de células T ativadas, exaustão imunológica e expressão de IL-10. Este ambiente de bloqueio imunológico pode servir como estratégia de evasão tumoral à lise mediada por células CD8+. A expressão do PD-L1 pode levar ao acúmulo de linfócitos Treg pela inibição de vias como a de mTOR, AKT, S6 além da fosforilação de ERK2 e o estímulo à expressão de PTEN, restringindo a ação das células T efetoras (Zhang et al. 2016).

Embora consistentes pela repetição dos resultados e pelas justificativas apontadas acima, estas meta-análises são passíveis de críticas e algumas delas podem ser usadas para embasar nosso achado de ausência de impacto da expressão do PD-L1 em sobrevida, no que pese as limitações de nossa própria análise, discutidas na próxima sessão. O primeiro senão é a ausência de uniformidade na metodologia apresentada para a detecção da expressão do PD-L1 nos diversos estudos, incluindo os valores de cut-offs, amostras e clones antigênicos empregados. Outro ponto é que parte destes estudos não traziam claramente os HRs com os

respectivos intervalos de confiança e em ambas as meta-análises parte destes dados foram extraídos das curvas de Kaplan-Meier, o que pode comprometer a exatidão dos dados (Zhang et al. 2016). E finalmente, estes dados refletem sobremaneira a população oriental representada em mais de 80% da amostra e não são capazes de avaliar o impacto da quimioterapia neoadjuvante, visto que também a imensa maioria, se não a totalidade dos casos arrolados receberam a cirurgia como o primeiro tratamento.

Ainda na linha de resultados conflitantes, uma análise merece destaque. Em 2019 pesquisadores coreanos reportaram uma análise *post hoc* do CLASSIC TRIAL, um estudo randomizado já citado aqui e que demonstrou o benefício da adição de quimioterapia baseada em platina e fluoropirimidina à cirurgia padronizada em pacientes com câncer gástrico. Nesta análise recém publicada cerca de metade dos casos (637 pacientes) do estudo tiveram amostras teciduais recuperadas para a pesquisa do status de instabilidade de microssatélites e da expressão do PD-L1. Esta última análise foi também realizada em TMA tal como nosso protocolo mas utilizando-se clone antigênico diferente (E1L3N *Cell Signaling)* e um critério de positividade diferente conforme a intensidade da marcação de células tumorais (tPD-L1) e células imunes (sPD-L1). Quarenta pacientes (6,8%) apresentaram MSI-H, dezesseis (2,7%) apresentavam positividade do PD-L1 em células tumorais e 165 (28,4%) em células imunes. A despeito do número pequeno de pacientes em cada categoria esta análise demonstrou que, de fato, a presença de MSI e de sPD-L1 (mas não o tPD-L1) conferiram um melhor prognóstico a estes grupos independente do uso de quimioterapia adjuvante. Mais relevante para nossa discussão aqui, a SLD estimada em cinco anos para pacientes sPD-L1 positivo foi de 71,0% versus 59,9% para pacientes sPD-L1 negativo. Enquanto o impacto prognóstico da MSI foi independente, o sPD-L1 se mostrou preditor de sobrevida apenas entre pacientes MSS.

Mas o mais intrigante aqui é que literalmente nenhuma destas análises avaliou casos de pacientes submetidos à tratamento neoadjuvante, ou seja, praticamente não há dados sobre o impacto da positividade do PD-L1 em sobrevida neste cenário. Até onde pudemos localizar, apenas as séries publicadas por Yu et al. e Hashimoto et al. em 2019 e Schoop et al. em 2020 abordaram o impacto da neoadjuvância nesta expressão e da positividade do PD-L1 em sobrevida. Detalhamos duas delas no fim da sessão sobre a expressão do PD-L1 e heterogeneidade tumoral mas deixamos a avaliação dos resultados de sobrevida e a discussão da série japonesa (Hashimoto et al. 2019) para serem analisados aqui. Na primeira série, uma grande proporção de casos cT4 (91.7%) e em estadio III (90%) foram arrolados. Talvez por isso a coorte apresentou uma SLD mediana de 20 meses e com SG mediana de 30.5 meses, bem abaixo dos resultados de nossa coorte. Como pontuamos anteriormente estes pesquisadores

detectaram um aumento da expressão do PD-L1 comparando as amostras pré e pós neoadjuvância, tal como nossa coorte. Além disso, apesar da expressão do PD-L1 pré-quimioterapia ter sido associada a pior resultado de sobrevida, um aumento na densidade de linfócitos CD8+ e da expressão de PD1 e PD-L1 foram caracterizados com efeito protetor na análise multivariada. A justificativa apontada pelos autores se assentou na hipótese de que esta maior expressão de proteínas de checkpoint imune estaria relacionada a uma intensa resposta adaptativa imunológica conferindo o beneficio detectado.

Em 2019 os pesquisadores da Universidade de Osaka publicaram a análise da expressão de PD-L1 e de MLH1 em pacientes submetidos ou não à quimioterapia neoadjuvante e sua correlação com resposta patológica e sobrevida (Hashimoto et al. 2019). Estes autores avaliaram esta expressão no espécimen cirúrgico, ou seja, naqueles pacientes que receberam a quimioterapia pré-operatória, a análise se deu após esta exposição. A expressão do PD-L1 esteve significativamente associada ao silenciamento de MLH1 e ao perfil de alta instabilidade de microssatélites. Embora este perfil tenha sido associado a pior resposta à quimioterapia, esta associação não foi demonstrada com o PD-L1, que também não impactou em resultado de SLD em ambos os grupos.

Já na série publicada este ano a comparação não foi pareada, mas sim entre um grupo de pacientes submetidos a cirurgia *upfront* e outro submetido à terapia neoadjuvante. Aqui um resultado oposto foi encontrado, uma vez que neste segundo grupo uma menor taxa de expressão do PD-L1 foi detectada e nenhum impacto desta expressão em sobrevida pareceu ocorrer. Por outro lado, na coorte de pacientes que receberam tratamento cirúrgico primário a maior expressão do PD-L1 esteve significativamente associada a um melhor prognóstico, tal como o sugerido pela coorte alemã e pela análise *post hoc* do CLASSIC TRIAL. Tais achados postulam que o valor prognóstico do PD-L1 possa ser modulado pela quimioterapia neoadjuvante e o fato de que em nossa coorte apenas as variáveis relacionadas ao estadiamento patológico final tenha se mostrado capaz de predizer os resultados de sobrevida nos parece corroborar esta sugestão.

7 LIMITAÇÕES E IMPACTO NA PRÁTICA CLÍNICA

Como em todas as análises retrospectivas, os resultados aqui apresentados devem ser interpretados com precaução e servem mais como geradores de hipóteses do que razões para qualquer mudança na prática clínica. O ponto negativo mais significativo nos parece ser o baixo percentual de amostras recuperadas para a análise imuno-histoquímica, o que pode comprometer a validade interna do estudo. Além disso, um possível viés de seleção pode estar ocorrendo aqui, uma vez que um dos motivos detectados para a não localização dos blocos de parafina no arquivo foi a retirada dos mesmos para testes adicionais na prática clinica, o que torna provável que justamente estes casos apresentassem mais chance de terem apresentado recidiva tumoral. Outra deficiência deste estudo assenta-se sobre a não análise de outros fatores sabidamente relacionados à expressão das proteínas de checkpoint imunes tais como o status de instabilidade de microssatélites e a hibridização para EBV, furtando-se assim à possibilidade de tecer importantes considerações prognósticas.

Por outro lado enxergamos aqui alguns pontos fortes que podem ser salientados. O primeiro é que a despeito da grande perda de amostras, o número de casos pareados analisados (74) é o maior que pudemos encontrar em literatura consultada até esta data. Além disso, nesta coorte os critérios para determinação da positividade do PD-L1 foram claramente estabelecidos e estão baseados naqueles utilizados na prática clinica amparada em estudos randomizados. O anticorpo utilizado e a metodologia empregada para a realização da imuno-histoquimica e sua interpretação tornam também estes resultados mais prováveis de serem reproduzidos. Além disso, a informação da divergência significativa entre a expressão do PD-L1 em amostras de biópsias e em peças cirúrgicas nos parece altamente relevante e merecedora de investigação mais pormenorizada.

8 CONCLUSÃO

Findo este trabalho, concluímos que a expressão do PD-L1 em uma coorte de pacientes com adenocarcinoma gástrico e de transição esôfago-gástrica brasileira foi menor que os percentuais referidos na literatura especialmente nas séries orientais e parece ser significativamente diferente em amostras de biópsias pré-neoadjuvância que nas peças cirúrgicas.

Determinamos ainda que a positividade do PD-L1 correlacionou-se com fatores já conhecidos como idade mais avançada, tumores proximais e de subtipo intestinal mas não com a resposta à quimioterapia neoadjuvante nem com o status do HER2.

E finalmente, não detectamos qualquer impacto em sobrevida atribuível à expressão PD-L1.

9 REFERÊNCIAS

Abrahao-Machado LF, Scapulatempo-Neto C. Her2 testing in gastric cancer: an update. World J Gastroenterol. 2016 May 21;22(19):4619-25.

Agilent Dako. Interpretation manual – gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma: PD-L1 IHC 22C3 pharmDx is FDA-approved for in vitro diagnostic use. Disponível em: <https://bit.ly/2x8cCiN> [2020 mar 4]

Al-Batran SE, Homann N, Schmalenberg H, Kopp H-G, Haag GM, Luley KB, et al. Perioperative chemotherapy with docetaxel, oxaliplatin, and fluorouracil/leucovorin (FLOT) versus epirubicin, cisplatin, and fluorouracil or capecitabine (ECF/ECX) for resectable gastric or gastroesophageal junction (GEJ) adenocarcinoma (FLOT4-AIO): a multicenter, randomized phase 3 trial. J Clin Oncol 2017; 35(Suppl 15):4004. [Presented at 53rd Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, 2-6 June, 2017, Chicago, Illinois]

Al-Batran SE, Homann N, Pauligik C, Goetze TO, Meiler J, Kasper S, et al. Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial. Lancet. 2019 May 11;393(10184):1948-57.

Alderson D, Cunningham D, Nankivell M, Blazeby JM, Griffin SM, Crellin A, et al. Neoadjuvant cisplatin and fluorouracil versus epirubicin, cisplatin, and capecitabine followed by resection in patients with oesophageal adenocarcinoma (UK MRC OE05): an open-label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol. 2017 Sep;18(9):1249-60.

Almeida MFA, Verza L, Bitencourt AGV, Boaventura CS, Barbosa PNVP, Chojniak R. Computed tomography with a stomach protocol and virtual gastroscopy in the staging of gastric cancer: an initial experience. Radiol Bras. 2018 Jul-Aug;51(4):211-7.

Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al. AJCC cancer staging manual. 8th ed. New York: Springer; 2017. Stomach; p.203-20.

Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet. 2010 Aug 28;376(9742):687-97.

Bang YJ, Kim YW, Yang HK, Chung HC, Park YK, Lee KH, et al. Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): a phase 3 open-label randomized controlled trial. Lancet. 2012 Jan 28;379(9813):315-21.

Brasil. Tribunal de Contas da União. Relatório de auditoria operacional na Política Nacional para a Prevenção e Controle do Câncer. Acordão 1944/2019. Plenário. Processo 023.655/2018-6. Relator: João Augusto Ribeiro Nardes. Brasília, 21 ago 2019.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018 Nov;68(6):394-424.

Becker K, Mueller JD, Schulmacher C, Ott K, Fink U, Busch R, et al. Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. Cancer. 2003 Oct 1;98(7):1521-30.

Becker K, Langer R, Reim D, Novotny A, Meyer zum Buschenfelde C, Engel J, et al. Significance of histopathological tumor regression after neoadjuvant chemotherapy in gastric adenocarcinomas. a summary of 480 cases. Ann Surg. 2011 May;253(5):934-9.

Böger C, Behrens HM, Mathiak M, Krüger S, Kalthoff H, Röcken C. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer in Western patients. Oncotarget. 2016 Apr 26;7(17):24269-83.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. Nature. 2014 Sep 11;513(7517):202-9.

Choi YY, Kim H, Yang HK, Kim WH, Kim YW, Kook M-C, et al. Clinical impact of microsatellite instability in patients with stage II and III gastric cancer: results from the CLASSIC trial. J Clin Oncol 2017; 35(suppl 15):4022. [Presented at 53rd Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, 2-6 June, 2017, Chicago, Illinois]

Choi YY, Kim H, Shin SJ, Kim HY, Lee J, Yang HK, et al. Microsatellite instability and Programmed Cell Death-Ligand 1 expression in stage II/III gastric cancer. Ann Surg. 2019 Aug;270(2):309-16.

Coimbra FJF, de Jesus VHF, Ribeiro HSC, Diniz AL, de Godoy AL, de Farias IC, et al. Impact of ypT, ypN and adjuvant therapy on survival in gastric cancer patients treated with perioperative chemotherapy and radical surgery. Ann Surg Oncol. 2019 Oct;26(11):3618-26.

Costa WL Jr, de Farias IC, Ribeiro HSC. Adenocarcinoma gástrico. In: Coimbra FJF, editor. Câncer do aparelho digestivo alto. São Paulo: Atheneu; 2013. p.29-42. (Rotinas do Departamento de Cirurgia Abdominal do A.C.Camargo Cancer Center)

Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, Kim KM, Ting JC, Wong SS, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. Nat Med. 2015 May;21(5):449-56.

Cunningham D, Allum AH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJ, Nicolson M, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. N Engl J Med. 2006 Jul 6;355(1):11-20.

Dai C, Wang M, Lu J, Dai Z, Lin S, Yang P, et al. Prognostic and predictive values of PD-L1 expression in patients with digestive system cancer: a meta-analysis. Onco Targets Ther. 2017 Jul 21;10:3625-34.

Davies AR, Gossage JA, Zylstra J, Mattsson F, Lagergren J, Maisey N, et al. Tumor stage after neoadjuvant chemotherapy determines survival after surgery for adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. J Clin Oncol. 2014 Sep 20;32(27):2983-90.

Davis AA, Patel VG. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker: an analysis os all US Food and Drug Administration (FDA) approvals of immune checkpoint inhibitors. J Immunother Cancer. 2019 Oct 26;7(1):278.

Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. Ann Surg. 2004 Aug;240(2):205-13.

deMartel C, Parsonnet J. Stomach cancer. In: Thun MJ, Linet MS, Cerhan JR, Haiman CA, Schottenfeld D, editors. Cancer epidemiology and prevention. 4th ed. New York: Oxford University Press; 2018. p.593-610.

Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. Nat Med. 2002 Aug;8(8):793-800.

Eto S, Yoshikawa K, Nishi M, Higashijima J, Tokunaga T, Nakao T, et al. Programmed cell death protein 1 expression is an independent prognostic factor in gastric cancer after curative resection. Gastric Cancer. 2016 Apr;19(2):466-71.

Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. Int J Cancer. 2019 Apr 15;144(8):1941-53.

Fuchs CS, Doi T, Jang RW, Muro K, Satoh T, Machado M, et al. Safety and efficacy of pembrolizumab monotherapy in patients with previously treated advanced gastric and gastroesophageal junction cancer: phase 2 clinical KEYNOTE-059 Trial. JAMA Oncol. 2018 May 10;4(5):e180013.

Gaule P, Smithy JW, Toki M, Rehman J, Patell-Socha F, Cougot D, et al. A quantitative comparison of antibodies to programmed cell death 1 ligand 1. JAMA Oncol. 2017 Feb 1;3(2):256-9.

Gu L, Chen M, Guo D, Zhu H, Zhang W, Pan J, et al. PD-L1 and gastric cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2017 Aug 10;12(8):e0182692.

Hashimoto T, Kurokawa Y, Takahashi T, et al. Predictive value of MHL1 and PD-L1 expression for prognosis and response to preoperative chemotherapy in gastric cancer. Gastric Cancer 2019. 22:785-792

Hou J, Yu Z, Xiang R, Li C, Wang L, Chen S, et al. Correlation between infiltration of FOXP3+ regulatory T cells and expression of B7-H1 in the tumor tissues of gastric cancer. Exp Mol Pathol. 2014 Jun 96(3):284-91.

Hu Y, Huang C, Sun Y, Su X, Cao H, Hu J, et al. Morbidity and mortality of laparoscopic versus open D2 distal gastrectomy for advanced gastric cancer: a randomized controlled trial. J Clin Oncol. 2016 Apr 20;34(12):1350-7.

Hu SB, Liu CH, Wang X, Dong YW, Zhao L, Liu HF, et al. Pathological evaluation of neoadjuvant chemotherapy in advanced gastric cancer. World J Surg Oncol. 2019 Jan 3;17(1):3.

Hur H, Lee H, Lee H, Kim MC, Hyung WJ, Park YK, et al. Efficacy of laparoscopic subtotal gastrectomy with D2 lymphadenectomy for locally advanced gastric cancer: the protocol of the KLASS-02 multicenter randomized controlled clinical trial. BMC Cancer. 2015 May 5;15:355.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Personal habits and indoor combustions. Volume 100 E: a review of human carcinogens. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2012;100(Pt E):1-538.

Japanese Gastric Cancer Association. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2018 (5th edition). Gastric Cancer 2020 feb 14. Epub ahead of print.

Jiang D, Xu YY, Li F, Xu B, Zhang XG. The role of B7-H1 in gastric carcinoma: clinical significance and related mechanism. Med Oncol. 2014 Nov;31(11):268.

Jim MA, Pinheiro PS, Carreira H, Espey DK, Wiggins CL, Weir HK. Stomach cancer survival in the United States by Race and Stage (2001 – 2009): Findings from the CONCORD-2 study. Cancer. 2017 Dec 15;123 Suppl 24:4994-5013.

Kang JH, Lee SI, Lim DH, et al. Salvage chemotherapy for pretreated gastric cancer: a randomized phase III trial comparing chemotherapy plus best supportive care with best supportive care alone. J Clin Oncol. 2012 May 1;30(13):1513-18.

Kang YK, Boku N, Satoh T, Ryu MH, Chao Y, Kato K, et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet. 2017 Dec 2;390(10111):2461-71.

Kwee RM, Kwee TC. Imaging in assessing lymph node status in gastric cancer. Gastric Cancer. 2009;12(1):6-22.

Khunger M, Hernandez AV, Pasupuleti V, Rakshit S, Pennell NA, Stevenson J, et al. Programmed cell death 1 (PD-1) ligand (PD-L1) expression in solid tumors as a predictive biomarker of benefit from PD-1/PD-L1 axis inhibitors: a systematic review and meta-analysis. JCO Precision Oncol 2017; 1:1-15.

Kim JW, Nam KH, Ahn SH, Park DJ, Kim HH, Kim SH, et al. Prognostic implications of immunosuppressive protein expression in tumors as well as immune cell infiltration within the tumor microenvironment in gastric cancer. Gastric Cancer. 2016 Jan;19(1):42-52.

Kim W, Kim H, Han S, Kim MC, Hyung WJ, Ryu SW, et al. Decreased morbidity of laparoscopic distal gastrectomy compared with open distal gastrectomy for stage I gastric cancer: short-term outcomes from a Multicenter Randomized Controlled Trial (KLASS-01). Ann Surg. 2016 Jan;263(1):28-35.

Klempner SJ, Frampton GM, Chao J, Bailey M, Stephens P, Ross JS, et al. Topography of tumor mutational burden (TMB) and immune-related genomic alterations (GA) across gastrointestinal malignancies (GIm): a study of 22,570 cases. Ann Oncol 2017; 28:1169P. [Presented at 42nd ESMO Congress (ESMO 2017), 8-12 September 2017, Madrid, Spain]

Kulangara K, Guerreiro L, Posch A, Boyer S, Hanks DA, Carnahan J, et al. Investigation of PD-L1 expression and response to pembrolizumab (pembro) in gastric cancer (GC) and cervical cancer (CC) using combined positive score (CPS) and tumor proportion score (TPS). J Clin Oncol 2018; 36(suppl 15):4065. [Presented at 54rd Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, 1-5 June, 2018, Chicago, Illinois]

Kulangara K, Zhang N, Corigliano E, Guerrero L, Waldroup S, Jaiswal D, et al. Clinical utility of combined positive score for programed death ligant-1 expresssion and the approval of pembrolizumab for treatment of gastric cancer. Arch Pathol Lab Med. 2019 Mar;143(3):330-7. Langer R, Becker K. Tumor regression grading of gastrointestinal cancer safter neoadjuvant therapy. Virchows Arch. 2018 Feb;472(2):175-86.

Laurén P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. an attempt at a histo-clinical classification. Acta Pathol Microbiol Scand. 1965;64:31-49.

Le DT, Uran JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 blockage in tumors with mismatch-repair deficiency. N Engl J Med. 2015 Jun 25;372(26):2509-20.

Lee HK, Yang HK, Kim WH, Lee KU, Choe KJ, Kim JP. Influence of the number of lymph nodes examined on staging of gastric cancer. Br J Surg. 2001 Oct;88(10):1408-12.

Leong T, Smithers BM, Haustermans K, Michael M, Gebski V, Miller D, et al. TOPGEAR: A randomized, phase III trial of perioperative ecf chemotherapy with or without preoperative chemoradiation for resectable gastric cancer: interim results from an International, Intergroup Trial of the AGITG, TROG, EORTC and CCTG. Ann Surg Oncol. 2017 Aug;24(8):2252-8.

Lin EM, Gong J, Klempner SJ, Chao J. Advances in immunooncology biomarkers for gastroesophageal cancer: Programmed death ligand 1, microsatellite instability, and beyond. World J Gastroenterol. 2018 Jul 7;24(25):2686-97.

Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. N Engl J Med. 2001 Sep 6;345(10):725-30.

Magalhães H, Fontes-Souza M, Machado M. Immunotherapy in advanced gastric cancer: an overview of the emerging strategies. Can J Gastreoenterol Hepatol. 2018 Jun 20;2018:2732408.

Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Marnay J, Henry-Amar M, Petiot JF, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. Cancer. 1994 Jun 1;73(11):2680-6.

Maron SB, Luke JJ, Hovey R, Bao R, Gajewski T, Ji Y, et al. Identification of T-cell inflamed gastric adenocarcinoma in The Cancer Genome Atlas (TCGA). J Clin Oncol 2017; 35(suppl 15):A16. [Presented at 53rd Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, 2-6 June, 2017, Chicago, Illinois]

McLean MH, El-Omar EM. Genetics of gastric cancer. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014 Nov;11(11):664-74.

Mheta R, Shah A, Almhanna K. Pembrolizumab for the treatment of patients with recurrent locally advanced or metastatic gastric or gastroesophageal junction cancer: an evidence-based review of place in therapy. Onco Targets Ther. 2018 Oct 4;11:6525-37.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa /2020 Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2020.

Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. Histopathology. 2020 Jan;76(2):182-8.

NCI-National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results program-SEER Cancer stat facts: stomach cancer. Bethesda, MD, Disponível em: <URL:https://bit.ly/2Nq09fx> [2019 fev 12].

Noh SH, Park SR, Yang HK, Chung HC, Chung IJ, Kim SW, et al. Adjuvant capecitabine plus

oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): 5-year follow-up of an openlabel, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol. 2014 Nov;15(12):1389-96.

Patil PA, Blakely AM, Lombardo KA, Machan JT, Miner TJ, Wang LJ, et al. Expression of PD-L1, indoleamine 2,3-dioxygenase and the immune microenvironment in gastric cancer adenocarcinoma. Histopathology. 2018 Jul;73(1):124-36.

Pereira MA, Ramos MFKP, Faraj SF, Faraj SF, Dias AR, Yagi OK, et al. Clinicopathological and prognostic features of Epstein-Barr vírus infection, microsatellite instability, and PD-L1 expression in gastric cancer. J Surg Oncol. 2018 Apr;117(5):829-39.

Plummer M, Franceschi S, Vignat J, Forman D, de Martel C. Global burden of gastric cancer attributable to Helicobacter pylori. Int J Cancer. 2015 Jan 15;136(2):487-90.

Qing Y, Li Q, Ren T, Xia W, Peng Y, Liu GL, et al. Upregulation of PD-L1 and APE1 is associated with tumorigenesis and poor prognosis of gastric cancer. Drug Des Devel Ther. 2015 Feb 16;9:901-9.

Ramos MFKP, Pereira MA, Yagi OK, Dias AR, Charruf AZ, Oliveira RJ, et al. Surgical treatment of gastric cancer: a 10-year experience in a high-volume university hospital. Clinics (Sao Paulo). 2018 Dec 10;73(suppl 1):e543s.

Sakuramoto S, Sasako M, Yamaguchi T, Kinoshita T, Fujii M, Nashimoto A, et al. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. N Engl J Med. 2007 Nov 1;357(18):1810-20.

Schoop H, Bregenzer A, Halske C, Behrens HM, Krüger S, Egberts JH, et al. Therapy resistance in neoadjuvantly treated gastric cancer and cancer of the gastroesophageal junction is associated with an increased expression of immune checkpoint inhibitors-comparison against a therapy naïve cohort. Transl Oncol. 2020 Feb;13(2):165-76.

Smyth EC, Wotherspoon A, Peckitt C, Gonzalez D, Hulkki-Wilson S, Eltahir Z, et al. Mismatch repair deficiency, microsatellite instability, and survival: an exploratory analysis of the Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy (MAGIC) Trial. JAMA Oncol. 2017 Sep 1;3(9):1197-203.

Stahl M, Walz MK, Stuschke M, Lehmann N, Meyer HJ, Riera-Knorrenschild J, et al. Phase III comparison of preoperative chemotherapy compared with chemoradiotherapy in patients with locally advanced adenocarcinoma of the esophagogastric junction. J Clin Oncol. 2009 Feb 20;27(6):851-6.

Taieb J, Moehler M, Boku N, Ajani JA, Yañez Ruiz E, Ryu MH, et al. Evolution of checkpoint inhibitors for the treatment of metastatic gastric cancers: current status and future perspectives. Cancer Treat Rev. 2018 May;66:104-13.

Tamura T, Ohira M, Tanaka H, Muguruma K, Toyokawa T, Kubo N, et al. Programmed Death-1 Ligand-1 (PDL1) expression is associated with the prognosis of patients with stage II/III gastric cancer. Anticancer Res. 2015 Oct;35(10):5369-76.

Tan P, Yeoh KG. Genetics and molecular pathogenesis of gastric adenocarcinoma. Gastroenterology. 2015 Oct;149(5):1153-1162.e3.

Tomasello G, Petrelli F, Ghidini M, Pezzica E, Passalacqua R, Steccanella F, et al. Tumor regression grade and survival after neoadjuvant treatment in gastro-esophageal cancer: a meta-analysis of 17 published studies. Eur J Surg Oncol. 2017 Sep;43(9):1607-16.

Tran PN, Sarkissian S, Chao J, Klempner SJ. PD-1 and PD-L1 as emerging therapeutic targets in gastric cancer: current evidence. Gastrointest Cancer. 2017;7:1-11.

Uson Junior PLS, Santos VM, Bugano DDG, Victor EDS, Rother ET, Maluf FC. Systematic review and meta-analysis of docetaxel perioperative chemotherapy regimens in gastric and esophagogastric tumors. Sci Rep. 2019 Nov 1;9(1):15806.

Yamashita K, Iwatsuki M, Harada K, Eto K, Hiyoshi Y, Ishimoto T, et al. Prognostic impacts of the combined positive score and the tumor proportion score for programmed death ligand-1 expression by double immunohistochemical staining in patients with advanced gastric cancer. Gastric Cancer. 2020 Jan;23(1):95-104.

Verheij M, Jansen EP, Cats A, va Grieken NCT, Aaronson NK, Boot H, et al. A multicenter randomized phase III trial of neo-adjuvant chemotherapy followed by surgery and chemotherapy or by surgery and chemoradiotherapy in resectable gastric cancer: first results from the CRITICS study. J Clin Oncol 2016; 34(suppl 15):4000. [Presented at 52rd Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, 3-7 June, 2016, Chicago, Illinois]

Vergadis C, Schizas D. Is Accurate N - Staging for Gastric Cancer Possible? Front Surg. 2018 May 31;5:41.

Vogelaar IP, van der Post RS, Bisseling TM, van Krieken JHJ, Ligtenberg MJ, Hoogerbrugge N. Familial gastric cancer: detection of a hereditary cause helps to understand its etiology. Hered Cancer Clin Pract. 2012 Dec 12;10(1):18.

Vraná D, Matzenauer M, Neoral C, Aujeský R, Vrba R, Melichar B, et al. From tumor immunology to immunotherapy in gastric and esophageal cancer. Int J Mol Sci. 2018 Dec 20;20(1):E13.

Xu X, Zheng G, Zhang T, Zhao Y, Zheng Z. Is pathological tumor regression grade after neo-adjuvant chemotherapy a promising prognostic indicator for patients with locally advanced gastric cancer? A cohort study evaluating tumor regression response. Cancer Chemother Pharmacol. 2019 Sep;84(3):635-46.

Wang L, Zhang Q, Ni S, Tan C, Cai X, Huang D, et al. Programmed death-ligand 1 expression in gastric cancer: correlation with mismatch repair deficiency and HER2 – negative status. Cancer Med. 2018 Jun;7(6):2612-20.

Wu P, Wu D, Li L, Chai Y, Huang J. PD-L1 and survival in solid tumors: a meta-analysis. PLoS One. 2015 Jun 26;10(6):e0131403.

Yamamoto Y, Fujisaki J, Omae M, Hirasawa T, Igarashi M. Helicobacter pylori-negative gastric cancer: characteristics and endoscopic findings. Dig Endosc. 2015 Jul;27(5):551-61.

Yang K, Zhu H, Chen CC, Wen TF, Zhang WH, Liu K, et al. Lessons learned from a case of gastric cancer after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a case report and literatures review. Medicine (Baltimore). 2016 Feb;95(7):e2666.

Ychou M, Boige V, Pignon JP, Conroy T, Bouché O, Lebreton G, et al. Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial. J Clin Oncol. 2011 May 1;29(13):1715-21.

Yu Y, Ma X, Zhang Y, Zhang Y, Ying J, Zhang W, et al. Changes in expression of multiple checkpoint molecules and infiltration of tumor immune cells after neoadjuvant chemotherapy in gastric cancer. J Cancer. 2019 Jun 2;10(12):2754-63.

Zhang L, Qiu M, Jin Y, Ji J, Li B, Wang X, et al. Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression on gastric cancer cells and its relationship with clinicopathologic factors. Int J Clin Exp Pathol. 2015 Sep 1;8(9):11084-91.

Zhang M, Dong Y, Liu H, Wang Y, Zhao S, Xuan Q, et al. The clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 expression in gastric cancer: a meta-analysis of 10 studies with 1,901 patients. Sci Rep. 2016 Nov 28;6:37933.

Zhu Y, Sun Y, Hu S, Jiang Y, Yue J, Xue X, et al. Comparison of five tumor regression grading systems for gastric adenocarcinoma after neoadjuvant chemotherapy: a retrospective study of 192 cases from National Cancer Center in China. BMC Gastroenterol. 2017 Mar 14;17(1):41.

Zilberstein B, Malheiros C, Lourenço LG, Kassab P, Jacob CE, Weston AC, et al. Brazilian consensus in gastric cancer: guidelines for gastric cancer in Brazil. Arq Bras Cir Dig. 2013 Jan-Mar;26(1):2-6.

Anexo 1 – Classificação de Clavien-Dindo para Complicações Pós-operatórias

Grau da Complicação	Definição
Grau 1	Qualquer desvio do pós-operatório esperado que não necessite tratamento específico.
Grau 2	Complicações que necessitem tratamento farmacológico, hemotransfusão ou suporte nutricional.
Grau 3	Alterações pós-operatórias que demandem tratamento invasivo (punções, drenagens e re-operações).
Grau 4	Complicações com risco iminente de óbito e necessidade de tratamento em terapia intensiva.
Grau 5	Óbito pós-operatório.

Anexo 2 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

A.C.Camargo Cancer Center
Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C.Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **04/06/2019,** após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de **09/04/2019, aprovaram** a realização do projeto nº **2685/19** intitulado: **"Expressão de PD-L1 em pacientes com adenocarcinoma gástrico antes e após tratamento neoadjuvante e correlação com desfechos clínicos."**

Pesquisador Responsável: Maria Dirlei Begnami de Souza
Aluno: Héber Salvador de Castro Ribeiro (Doutorado)

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

São Paulo, 07 de junho de 2019.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Caires Serrano
1ª. Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Rua Professor Antônio Prudente, 211 • Liberdade • São Paulo / SP • CEP 01509-900
(11) 2189-5000 • www.accamargo.org.br