

**ADENOCARCINOMAS DO ESTÔMAGO  
RELACIONADOS COM O VÍRUS DE EPSTEIN-BARR:  
ESTUDO DOS ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E  
A RELAÇÃO COM O INFILTRADO LINFOCITÁRIO  
COM ÊNFASE NA EXPRESSÃO DE PD-L1**

**CARLOS CESAR DE OLIVEIRA RAMOS**

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

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**

**São Paulo**

**2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Ramos, Carlos Cesar de Oliveira

**Adenocarcinomas do estômago relacionados com o vírus de Epstein-Barr: estudo dos aspectos clínico-patológicos e a relação com o infiltrado linfocitário com ênfase na expressão de PD-L1** / Carlos Cesar de Oliveira

Ramos - São Paulo, 2019.

70p.

Tese(Doutorado)-Fundação Antônio Prudente

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. Neoplasias Gástricas/Stomach Neoplasms. 2. Infecções por Vírus Epstein-Barr/Epstein-Barr Virus Infections. 3. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 4. Estudo Observacional/Observational Study. 5. Gastrectomia/Gastrectomy. 6. Expressão de PD-L1/PD-L1 expression

## **DEDICATÓRIA**

**A Dr. Carlos Cesar Formiga Ramos, pessoa íntegra e de grande coração, sempre buscando fazer o bem a todos que o cercavam. Tive a sorte de tê-lo como professor e mentor e o grande privilégio de tê-lo como pai. Uma grande tristeza não ter sua presença entre nós.**

## **AGRADECIMENTOS**

**À minha família, Janaína, Maria Eduarda e Matheus, base para que eu pudesse construir esse caminho, agradeço pelo apoio e confiança que sempre tiveram por mim.**

**À Dra. Ana Maria, exemplo de sapiência e resiliência. Mãe e professora incansável que sempre foi meu exemplo e inspiração.**

**A Dr. Alexandre Sales, amigo e exemplo de integridade e retidão. Apoio incondicional para que eu pudesse cumprir essa jornada.**

**A todos do Laboratório Médico de Patologia Dr. Getúlio de Oliveira Sales, minha segunda família, onde posso exercer o melhor da minha profissão.**

**À Liga contra o Câncer, local que devo parte da minha formação e onde pude aprender e evoluir como profissional.**

**Aos amigos e colegas de trabalho, Dr. Hildemárzio e Dra. Maíra, pela ajuda incondicional durante minhas ausências.**

## RESUMO

Ramos CCO. **Adenocarcinomas do estômago relacionados com o vírus de Epstein-Barr: estudo dos aspectos clínico-patológicos e a relação com o infiltrado linfocitário com ênfase na expressão de PD-L1.** São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O adenocarcinoma gástrico associado ao vírus Epstein-Barr (EBV) corresponde a cerca de 10% dos carcinomas gástricos, ocorre mais frequentemente em pacientes mais jovens e acomete preferencialmente a porção proximal do estômago. São tumores que com maior frequência exibem um crescimento sólido, associado a um infiltrado linfocitário exuberante. A imunoterapia tem trazido uma nova perspectiva para o tratamento de vários tumores e conseqüentemente a avaliação do PD-L1 tem sido amplamente estudada, incluindo tumores gástricos. Foram avaliados 269 casos de adenocarcinomas gástrico operados na Liga contra o câncer do estado do Rio Grande do Norte com a finalidade de avaliar os dados clínico-patológicos, a frequência de casos associados a EBV, a expressão de PD-L1 e p16 e o infiltrado de linfócitos CD8 e CD4 intra e peritumorais. Foram identificados 17 casos (6,32%) de adenocarcinomas associados à EBV (AdG-EBV). Estes ocorreram mais frequentemente em pacientes acima de 50 anos (60%), com estágio T3/T4 em 94,12% e com acometimento linfonodal em 84,03%. O infiltrado linfocitário CD8 e CD4 positivos foi observado em todos os casos, expressão de PD-L1 em 82,35% e de p16 em 35,29% dos tumores. Nos adenocarcinomas não associados à EBV (AdG-não-EBV) houve predomínio em pacientes acima de 50 anos, com estágio T3/T4 em 79,6%, com acometimento linfonodal em 65,48%, infiltrado linfocitário CD8 e CD4 positivos em 66,5% e 73,02 respectivamente e expressão de p16 em 67,86% dos tumores. Foi demonstrado uma menor frequência de AdG-EBV no presente estudo quando comparado com a literatura. A grande maioria acometeu pacientes acima de 50 anos, estava em estádios avançados e com

linfonodos acometidos semelhantes aos tumores não associados à EBV. Porém, mais frequentemente expressaram PD-L1 e com infiltrado de linfócitos CD8 e CD4 positivos. O p16 foi expresso em menor frequência, não sendo possível ser usado como um biomarcador da infecção pelo EBV.

**Descritores:** Neoplasias Gástricas. Infecções por Vírus Epstein-Barr. Imuno-Histoquímica. Estudo Observacional. Gastrectomia. Expressão de PD-L1

## SUMMARY

Ramos CCO. [**Gastric adenocarcinoma associated with Epstein-Barr virus: a clinical-pathological study and the relationship to lymphocytic infiltrates with focus on PD-L1 expression**]. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Gastric adenocarcinoma associated with the Epstein-Barr virus (EBV) corresponds to about 10% of gastric carcinomas, occurs more frequently in younger patients and affects the proximal portion of the stomach preferentially. They are tumours that more frequently exhibit a solid growth, associated with an exuberant lymphocytic infiltrate. Immunotherapy has been placed into a new perspective for the treatment of several tumours and consequently the assessment of PD-L1 has been extensively studied, including in gastric tumours. 269 cases of gastric adenocarcinomas were analyzed in the Liga Contra o Cancer in the state of Rio Grande do Norte in order to evaluate the clinical-pathological data, frequency of cases associated with EBV, PD-L1 and p16 status and infiltrate of CD8 and CD4 lymphocytes intra and peritumoral. It was identified 17 cases (6.32%) of EBV-associated adenocarcinomas (AdG-EBV). These occurred more frequently in patients over 50 years (60%), with T3 / T4 stage in 94.12% and with lymph node involvement in 84.03%. CD8 and CD4 positive lymphocytic infiltrates were observed in all cases, PD-L1 expression in 82.35% and p16 in 35.29% of tumours. Adenocarcinomas not associated with EBV (AdG-non-EBV) were predominant in patients over 50 years of age, with T3 / T4 stage in 79.6%, with lymph node involvement in 65.48%, CD8 and CD4 lymphocytic infiltrate in 66, 5% and 73.02 respectively and p16 expression in 67.86% of the tumours. A lower frequency of AdG-EBV was demonstrated in the present study when compared with the literature. The vast majority of the cases occurred in patients over 50 years of age, in advanced stages and with lymph nodes metastasis similar to tumours not associated with EBV. However, they more frequently expressed PD-L1 and

with CD8 and CD4 positive lymphocyte infiltrates. P16 was expressed less frequently and could not be used as a biomarker of EBV infection.

**Key-words:** Stomach Neoplasms. Epstein-Barr Virus Infections. Immunohistochemistry. Observational Study. Gastrectomy. PD-L1 expression



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Curva demonstrando a tendência de incidência e mortalidade nos Estados Unidos de 1992 a 2014 .....	2
<b>Figura 2</b>	Incidência estimada de câncer gástrico em homens, por 100.000 habitantes, por estado da Federação em 2018 .....	4
<b>Figura 3</b>	Incidência estimada de câncer gástrico em mulheres, por 100.000 habitantes, por estado da Federação em 2018 .....	5
<b>Figura 4</b>	Sobrevida proporcional de acordo com o estágio ao diagnóstico nos AdG nos Estados Unidos da América, no período 2008-2014.	7
<b>Figura 5</b>	Padrões histológicos de AdG em secções coradas por H&E (H&E X 200) .....	45
<b>Figura 6</b>	Padrões histológicos de AdG negativo e positivo .....	45
<b>Figura 7</b>	Expressão de marcadores de imunohistoquímica .....	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Incidências do AdG comparando as estimativas dos anos de 2014 e 2018, de acordo com o INCA .....	4
<b>Tabela 2</b>	Resumo da frequência da expressão de PD-L1 em AdG .....	33
<b>Tabela 3</b>	Anticorpos utilizados nesta investigação .....	38
<b>Tabela 4</b>	Subtipos histológicos de adenocarcinomas gástrico EBV positivos .....	39
<b>Tabela 5</b>	Subtipos histológicos de adenocarcinomas gástrico EBV negativos.....	40
<b>Tabela 6</b>	Expressão de PD-L1, CD4, CD8, p16 em adenocarcinomas gástricos.....	41
<b>Tabela 7</b>	Distribuição dos casos EBV+/EBV- em relação a distribuição da Idade .....	42
<b>Tabela 8</b>	Distribuição dos casos EBV+/EBV-em relação a estágio linfonodal.....	42
<b>Tabela 9</b>	Distribuição dos casos EBV+/EBV- em relação a estágio T ....	43

<b>Tabela 10</b> Distribuição dos casos EBV+/EBV- em relação à expressão de PD-L1+ .....	43
<b>Tabela 11</b> Distribuição dos casos EBV+/EBV- em relação à expressão de CD4+ .....	44
<b>Tabela 12</b> Distribuição dos casos EBV+/EBV- em relação à expressão de CD8+ .....	44
<b>Tabela 13</b> Distribuição dos casos EBV+/EBV- em relação à expressão de p16 .....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AdG</b>	Adenocarcinoma gástrico
<b>AdG-EBV</b>	Adecarcinoma associado ao EBV
<b>AdG-não-EBV</b>	Adecarcinoma não associado ao EBV
<b>AJCC</b>	American Joint Committee on Cancer
<b>CCAS</b>	Carcinoma de células em anel de sinete
<b>EBV</b>	Vírus de Epstein-Barr
<b>GIST</b>	Gastrintestinal stromal tumor
<b><i>Hp</i></b>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>LN</b>	Linfonodo
<b>MALT</b>	Mucosa associated lymphoid tissue
<b>QT</b>	Quimioterapia
<b>SEER</b>	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results Program</i>
<b>TCGA</b>	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
<b>TEM</b>	Transição epitélio-mesênquima

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	O problema do adenocarcinoma gástrico no Brasil e na América Latina: incidência, prevalência e mortalidade .....	1
1.2	Os tipos histológicos de câncer gástrico e a classificação histopatológica do adenocarcinoma .....	14
1.3	Estado atual do conhecimento da patogênese molecular/celular do câncer gástrico .....	18
1.4	Adenocarcinomas gástricos associados à infecção pelo vírus de Epstein-Barr.....	20
1.5	Os receptores de check-point (PD-L1) .....	23
1.5.1	Mecanismos de apresentação antigênica às células T .....	25
1.5.2	Mecanismos PD1 dependentes de supressão de células T .....	27
1.6	Expressão de PD-L1 e os AdG associados à EBV.....	31
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
3.1	Seleção dos Pacientes .....	35
3.2	Aspectos Éticos .....	36
3.3	Construção do TMA.....	36
3.4	Deteção da infecção pelo EBV por hibridização in situ.....	37
3.5	Deteção da expressão proteica por imuno-histoquímica .....	37
3.6	Análise Estatística .....	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
4.1	Caracterização Demográfica e Anatomo-patológica .....	39
4.2	Resultados em relação aos Marcadores .....	40
4.3	Comparação entre os AdG-EBV versus os AdG não-relacionados ao EBV .....	41

5	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
5	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>50</b>
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>

**ANEXO**

**Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

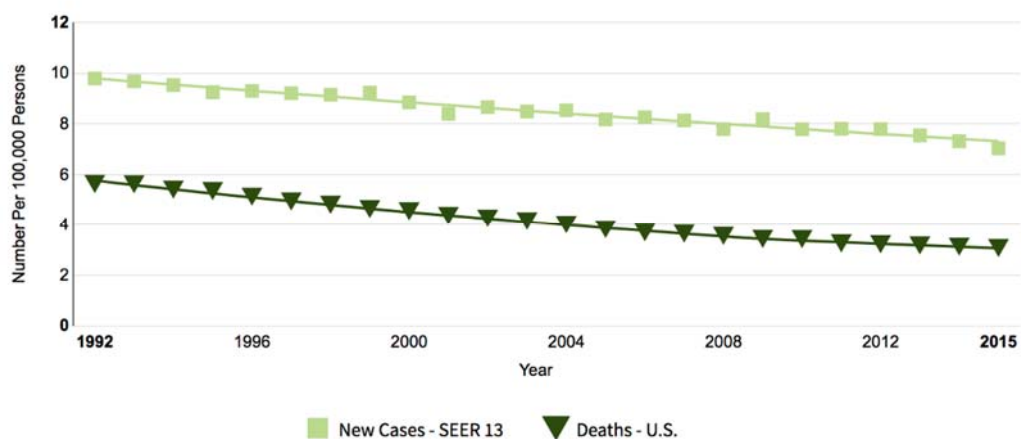
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A PROBLEMÁTICA DO CARCINOMA GÁSTRICO NO BRASIL E NA AMÉRICA LATINA: INCIDÊNCIA, PREVALÊNCIA E MORTALIDADE

O câncer gástrico é ainda um grande problema mundial, a despeito da incidência do adenocarcinoma gástrico (AdG) ter apresentado queda importante nos últimos 70 anos (PARKIN et al. 1993; BERTUCCIO et al. 2009). O AdG é a quinta neoplasia maligna mais frequente (terceira em homens) e a segunda causa de morte por câncer em todo mundo (PARKIN et al. 2004; BRAY et al. 2013).

Anualmente 800.000 pessoas irão ter câncer gástrico e cerca de 700.000 irão morrer pela doença (STEWART e KLEIHUES 2003). Nos Estados Unidos dados do *Surveillance, Epidemiology and End Results Program* (SEER) estimaram 26.240 casos novos (cerca de 1,5% de todas neoplasias malignas) com 10.800 mortes em 2018 (National Cancer Institute-NCI 2018). Estes números demonstram que a relação caso novo/mortalidade é muito maior do que as neoplasias mais prevalentes no mundo, o que aumenta em muito a importância do seu estudo (NAGINI 2012). No Brasil, a sobrevida no primeiro ano da doença é de apenas 32% e ao final de cinco anos é de 9% (BUSTAMANTE-TEIXEIRA et al. 2006). Este cenário não é diferente em outras partes do mundo, mesmo em países desenvolvidos

(COUPLAND et al. 2012). Nos Estados Unidos a mortalidade global mostra uma tendência de queda ao longo das últimas décadas, mas apenas cerca de 31% dos pacientes estão vivos após cinco anos (NCI 2018). Esta tendência pode ser vista na Figura 1.



Fonte: NCI (2018)

**Figura 1** - Curva demonstrando a tendência de incidência e mortalidade nos Estados Unidos de 1992 a 2014

As maiores taxas de incidência ocorrem nos países em desenvolvimento e as menores na América do Norte, no norte da Europa, na África e no Sul da Ásia (BERTUCCIO et al. 2009). O AdG ocorre mais frequentemente em países com índice de desenvolvimento humano médio (BRAY et al. 2013). A baixa incidência na África, que é de 3-4/100.000, é muito intrigante, pois a frequência de infecção pelo *Helicobacter pylori* (*Hp*) e a presença da gastrite atrófica/metaplasia intestinal são bastante altas (ASOMBANG e KELLY 2012). Os países Orientais, como o Japão, a China e a Coreia do Sul, têm taxas de incidência maiores do que 30/100.000 (casos



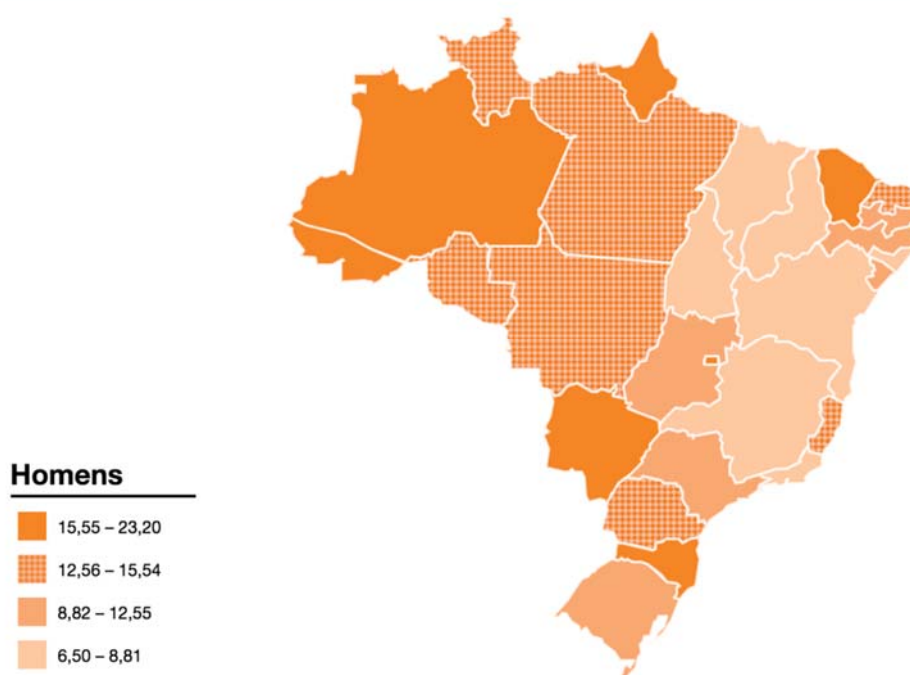
novos/habitantes) e que também nestes países as taxas são decrescentes (JING et al. 2012). Na América do Sul a maior incidência está entre os povos andinos (PEREIRA et al. 2012). Esta diferença entre as taxas de incidência entre os países chega a ordem de grandeza de 20 vezes.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer no Brasil (INCA), para o biênio 2018-2019, foram estimados cerca de 21.290 casos novos de AdG, sendo 13.540 casos novos entre os homens e 7.750 entre as mulheres (Ministério da Saúde 2018).

Em 2014 os dados correspondiam a um risco estimado de 13,04:100.000 em homens e 7,37:100.000 em mulheres (Ministério da Saúde 2014). Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, o câncer de estômago, no Brasil é o segundo tipo mais frequente em homens nas regiões Norte (12,35:100.000) e Nordeste (11,17:100.000); e o quarto nas Regiões Centro-Oeste (11,52/100.000) e Sul (17,12/100.000) e o quinto na Região Sudeste (13,46:100.000). Para as mulheres, é o quinto mais frequente na Região Norte (5,34:100.000), Região Sul (8,95:100.000) e Centro-Oeste (6,52:100.000). Na região Nordeste (7,16/1000) é o sexto e na região Sudeste (7,41:100.000) está na sétima posição (Ministério da Saúde 2018). Diferentemente de outros locais do mundo, a Tabela 1 demonstra a comparação entre as estatísticas de 2014 e 2018 e nela pode-se notar que as diferenças são pequenas, e na maioria das vezes para maiores. Os dados por Unidade da Federação podem ser observados nas Figuras 2 e 3.

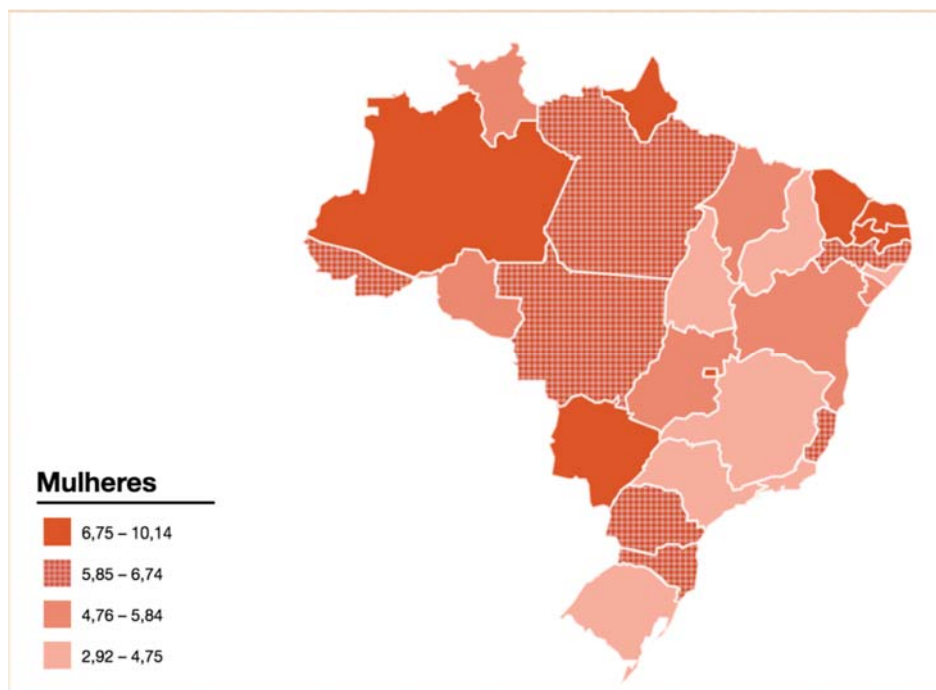
**Tabela 1** - Incidências do AdG comparando as estimativas dos anos de 2014 e 2018, de acordo com o INCA.

Região	Homens (2014/2018)	Mulheres (2014/2018)
Sul	17,13/17,12	8,71/8,95
Sudeste	13,79/13,46	7,82/7,41
Centro-Oeste	11,5/11,52	6,35/6,52
Nordeste	10,67/11,17	6,73/7,16
Norte	11,62/12,35	5,82/5,34



**Fonte:** Ministério da Saúde (2018).

**Figura 2** - incidência estimada de câncer gástrico em homens, por 100.000 habitantes, por estado da Federação em 2018.



**Fonte:** Ministério da Saúde (2018).

**Figura 3** - Incidência estimada de câncer gástrico em mulheres, por 100.000 habitantes, por estado da Federação em 2018.

O índice de mortalidade por câncer gástrico segue o mesmo padrão de distribuição geográfica (MATSUDA e MACHII 2012). Na América Latina, países como o Chile, Peru, Costa Rica e Equador tem taxas de mortalidade maiores do que 20:100.000 (BOSETTI et al. 2006), similares às encontradas na Índia (DIKSHIT et al. 2012). As taxas de mortalidade por câncer gástrico apresentam diminuição em praticamente todo o mundo, incluindo na América Latina (BOSETTI et al. 2006). Esta diminuição se deve muito mais ao diagnóstico em estádios mais precoces do que a reais avanços no manuseio do AdG. Isto é principalmente notado nos países orientais, onde um grande investimento no diagnóstico precoce foi realizado (KIM et al. 2011).

Embora tenha sido constatado um grande declínio da mortalidade pelo câncer gástrico no Brasil, esta continua apresentando índices bastantes elevados (LATORRE 1997; CHATENOUUD et al. 2010; SILVA et al. 2011) ao longo das décadas. De acordo com o INCA, os índices de mortalidade para o período de 2006-10 foi de 9,7:100.000 para os homens e de 6,1:100.000 para as mulheres (Ministério da Saúde 2013) e para 2015 estimou-se 9.132 mortes em homens (terceira causa de morte por câncer entre os homens) e 5.132 casos entre as mulheres (quinta causa de morte nas mulheres) (Ministério da Saúde 2018).

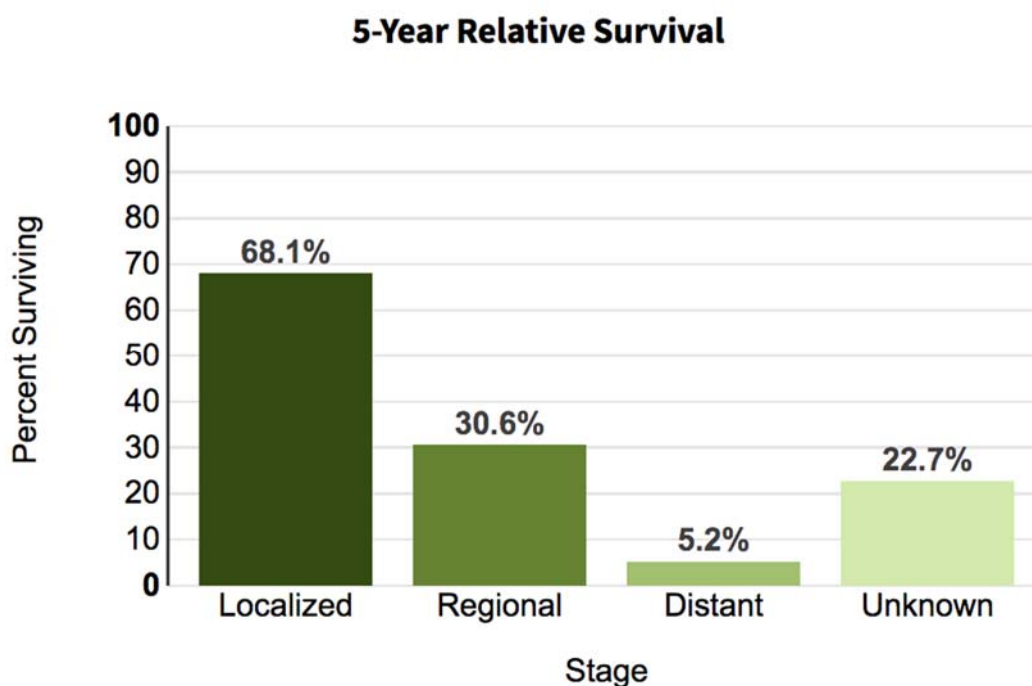
A análise mais detalhada por região do País mostrou que a mortalidade masculina no Nordeste está aumentando e que a da região Norte está inalterada (em ambos os gêneros), enquanto que nas demais regiões do País demonstrem uma tendência de queda (GUIMARÃES e MUZI 2012).

Algumas grandes cidades brasileiras que notadamente têm alta incidência de AdG, como por exemplo Belém (PA) e Fortaleza (CE), apresentam queda na mortalidade com velocidade menor do que a apresentada no país e ainda apresenta índices elevadíssimos, especialmente no sexo masculino (LATORRE et al 1997; LOURENÇO e HAMADA 2001; RESENDE et al. 2006). Estas diferenças regionais são observadas em outras partes do mundo, como no Iran, cujo índice de mortalidade por câncer gástrico é seis vezes maior no Norte do País (ZENDEHDEL et al. 2012).

A mortalidade do câncer de estômago é dependente do estágio do diagnóstico da doença. Mesmo nos Estados Unidos cerca de 62% dos casos

são diagnosticados já com doença loco-regional avançada (27%) ou com disseminação a distância (35%).

Apenas 28% são identificados com doença localizada e 10% o estadiamento é desconhecido, o que faz supor ainda maiores números para a doença avançada (NCI 2018). Este dado é altamente relacionado com a mortalidade somente 30,6% dos casos com doença loco-regional e 5,2% dos casos com doença disseminada estarão vivos após cinco anos, conforme pode ser vista na Figura 4.



Fonte: NCI (2018)

**Figura 4** - Sobrevida proporcional de acordo com o estágio ao diagnóstico nos AdG nos Estados Unidos da América, no período 2008-2014

Também há marcadas diferenças das taxas de incidência e mortalidade entre diversos grupos étnicos. Nos Estados Unidos, os afrodescendentes, hispânicos e aborígenes são mais afetados do que os caucasianos (NAGINI 2012) e os hispânicos tem incidência muito superior à população não-hispânica (HAILE et al. 2012). Na Califórnia, observou-se um aumento da incidência em homens latinos nascidos fora dos EUA e nas mulheres americanas latino-descendentes (CHANG et al. 2012). Na Nova Zelândia, os Maoris são mais afetados do que a população caucasiana (PARKIN et al. 2004). Na Inglaterra, indivíduos negros com origem na região do Caribe tem maior incidência (COUPLAND et al. 2012).

Estas diversidades regionais e étnicas na incidência e mortalidade sugerem diferenças na exposição a fatores ambientais e nutricionais, criando áreas de alto e baixo risco mesmo dentro de um mesmo país (PARKIN et al. 2004). No Brasil, os afrodescendentes e mestiços tem risco maior quando comparado aos brancos (BOUCHARDY et al. 1991) e os brasileiros descendentes de portugueses mantêm o alto risco para AdG da população de origem (BOUCHARDY et al. 1993). Não há diferenças entre a incidência do AdG em áreas industrializadas e rurais (MEDRADO-FARIA et al. 2001), embora a mortalidade seja maior entre os trabalhadores rurais (MEYER et al. 2003).

Em relação a etnia, temos que lembrar que a grande imigração japonesa cria alguns aspectos interessantes quando aos brasileiros descendentes. O AdG é o câncer mais incidente neste grupo e a mortalidade entre estes descendentes é cerca de 50% maior quando comparada aos

brasileiros não descendentes, mas menor do que aquela observada no Japão (TSUGANE et al. 1990; IWASAKI et al. 2004). O mesmo não foi constatado em relação a migrantes japoneses no Paraná onde o padrão de mortalidade por câncer gástrico se aproximou da população local (DE SOUZA e GOTLIEB 1999). A exemplo da população japonesa, os brasileiros descendentes de japoneses têm nível baixo de pepsinogênio sérico e títulos mais baixos de IgG anti-*H. Pylori* (FAHEY et al. 2000; FUJIOKA et al. 2001). A introdução do consumo de carne pode ser responsável pela manutenção da alta prevalência de AdG entre esta população (HAMADA et al. 2002). Há diferenças marcadas em relação ao polimorfismo do gene CYP2E1 RSA1 entre as duas populações (NISHIMOTO et al. 2000).

O AdG é uma doença em que a sintomatologia ocorre somente quando o tumor está em fases avançadas, o que explica o índice de sobrevida menor do que 20% em 5 anos (NAGINI 2012) e conforme documentado pelo SEER e demonstrado anteriormente neste documento. Os tratamentos atuais, tanto a cirurgia como a quimioterapia (QT), têm pouca eficácia nos casos avançados e as terapias alvo-disponíveis estão restritas ao uso de trastuzumabe associado à QT (DE VITA et al. 2010). A estratégia de uso de marcadores séricos únicos para o AdG são pouco específicas, mas novas abordagens com painéis de marcadores determinados por técnicas proteômicas de larga escala são bastante promissoras (AHN et al. 2012). Por estas razões, é mandatório o estabelecimento de estratégias para o diagnóstico precoce. As mais recomendadas na literatura incluem escrutínio e erradicação da infecção pelo Hp, seguimento endoscópico e histopatológico

de lesões pré-neoplásicas, restrição a dietas ricas em alimentos salgados e defumados e orientação alimentar (CORREA et al. 2004).

Recentemente foram estabelecidas orientações-padrões para o manuseio e seguimento das lesões pré-neoplásicas (DINIS-RIBEIRO et al. 2012). Uma perspectiva interessante e inovadora é o uso de perfis proteômicos da saliva como método de rastreamento (CASTAGNOLA et al. 2011).

O estadiamento do AdG foi recentemente modificado e publicado pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC/UICC) (AJANI et al. 2017). Nesta edição foram incluídos os estadiamentos clínicos e pós-tratamento neoadjuvante, criando-se assim o cTNM e ypTNM. Os tumores da junção esofagogástrica são estadiados junto com os tumores esofágicos se o epicentro do tumor for  $\leq 2$  cm no estômago proximal. Tumores com epicentro  $\geq 2$  cm são estadiados como tumores gástricos.

O estadiamento patológico (pTNM) não sofreu alterações em relação à edição anterior, onde T1 são tumores que invadem a até a submucosa. Estes são subdivididos em T1a, quando invadem a lâmina própria e a muscular da mucosa e em T1b, quando há invasão da submucosa. Usa-se T2 para tumores que invadem a camada muscular própria e T3 para tumores que penetram o tecido conjuntivo da subserosa sem invasão do peritônio visceral ou de estruturas adjacentes. A categoria T4 é subdividida em T4a para tumores que invadem o peritônio visceral e T4b para tumores que invadem estruturas ou órgãos adjacentes. A categoria N apresentam 5 divisões de acordo com o número de linfonodos (LN) acometidos: N0, sem linfonodos



acometidos; N1: 1-2 LN+; N2: 3-6 LN+; N3: 7 ou mais LN+, sendo N3a entre 7-15 LN+ e N3b com mais de 15 LN+. A citologia peritoneal com células neoplásicas é considerada como M1, bem como a presença de metástase à distância confirmada histologicamente também deve ser classificada como pM1 (AJANI et al. 2017).

O tratamento padrão para o AdG é a gastrectomia com esvaziamento linfonodal. Não cabe a esta revisão discutir todos os aspectos e controvérsias sobre o tratamento cirúrgico. Estas controvérsias estão, em sua maioria, na extensão da dissecação linfonodal, fazendo que a comparação dos resultados entre o Ocidente e os países Orientais seja bastante difícil (AJANI et al. 2013).

Proposta como a gastrectomia total laparoscópica encontra na propriedade da dissecação linfonodal sua maior dificuldade (JEONG et al. 2013). Mesmo para a doença avançada, se o tumor é ressecável, é o único tratamento curativo, mesmo com índice de recidiva loco-regional muito alto (ACCETTA et al. 2011; DIKKEN et al. 2012; AOYAGI et al. 2013). No sentido de reduzir a morbidade do tratamento, cirurgias reduzidas têm sido propostas, especialmente quando os linfonodos sentinelas são negativos (BRAVO-NETO et al. 2012).

Várias estratégias de quimio/radioterapia têm sido tentadas, mas nenhuma delas pode ainda ser considerada padrão (DIKKEN et al. 2012). Muitos ensaios terapêuticos de quimioterapia (QT) neoadjuvante e adjuvante têm estabelecido condutas com pequeno ganho de sobrevida e alta toxicidade (DIKKEN et al. 2012). Entretanto, parece indiscutível que há ganho de

sobrevida com o uso de QT quando comparado com o melhor tratamento de suporte isolado (CASARETTO et al. 2006; KANG et al. 2012).

Em nosso meio, a QT neoadjuvante tem sido relatada com resultados promissores (JÁCOME et al. 2012), bem como a QT hipertérmica intraperitoneal (COSTA et al. 2012; GOSLIN et al. 2012). Outras novas terapias têm sido tentadas como a QT intra-operatória, a radioterapia intra/pós-operatória e combinações entre elas. Uma das grandes críticas que se faz a estes ensaios é que não ha esquemas alternativos entre AdG de cárdia e não-cárdia e sabemos que esta separação topográfica tem grandes implicações prognósticas e biológicas (DIKKEN et al. 2012).

Mais recentemente estudos diferenciando estes tumores têm sido publicados, como o uso de radioterapia neoadjuvante e terapias-alvo nos adenocarcinomas da junção gastro-esofágica (FERTE et al. 2011; BUERGY et al. 2012; CAPPETTA et al. 2012; KOFOED et al. 2012). Há diversos esquemas experimentais promissores para a doença avançada/metastática (MOHAMMAD et al. 2011, SHEN et al. 2011; BANG et al. 2012; CHO et al. 2012; DAI et al. 2012; HARDER et al. 2012; INAL et al. 2012; IWASA et al. 2012; JO et al. 2012; KIM et al. 2012).

Mais recentemente tivemos a incorporação do uso da imunoterapia para os pacientes com AdG avançado. Esta indicação se restringe ao uso de Pembrolizumab para pacientes com AdG (do próprio órgão ou da junção gastro-esofágica) avançado, com exposição prévia a dois ou mais esquemas de quimioterapia e com a exposição a trastuzumab quando o tumor é HER-2 positivo. Como “companion test” para esta indicação, temos a expressão

combinada de Pd-L1 medida por imunohistoquímica nas células tumorais e em células da resposta imune associada à neoplasia. Esta é mensurada pelo CPS (do inglês *combined proportion score*) e o nível de corte é o índice maior ou igual a um. Para tal, se avaliam todas as células que se coram com o uso do anticorpo anti-Pd-L1 22C3 (Dako-Agilent) e se usa como denominador o número de células neoplásicas na área de interesse. Então a formula é:

$$\text{CPS} = \frac{\text{células neoplásicas positivas} + \text{células imunes positivas}}{\text{Total de células tumorais na área avaliada}} \times 100$$

Notar que o número é absoluto e não de percentual, e são considerados passíveis de tratamento imunoterápicos os casos cujo CPS é maior ou igual a um.

A base de aprovação para o AdG foi realizada através do estudo KEYNOTE-059. Neste estudo a taxa de resposta na população geral foi de 11,6% com resposta completa em 2,3% com a duração mediana de 8,4 meses. Quando analisados somente os casos PD-L1 com CPS maior ou igual a um, a taxa de resposta foi de 15,5% com mediana de resposta de 16,3 meses (FUCHS et al. 2018).

## 1.2 OS TIPOS HISTOLÓGICOS DE CÂNCER GÁSTRICO E A CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO ADG

O estômago pode ser sítio primário de diversos tipos histológicos incluindo neoplasias epiteliais, mesenquimais e linfohematopoéticas. As neoplasias epiteliais são as mais frequentes e incluem, além dos adenocarcinomas clássicos, diversas neoplasias ocasionais como carcinomas hepatoides, coriocarcinomas, carcinomas embrionários, carcinomas neuroendócrinos, entre outras. Os linfomas formam o segundo grande grupo em frequência, sendo que a maioria deles é constituído por linfomas de baixo grau do tipo da zona marginal extra nodal (linfoma MALT, do inglês *mucosa associated lymphoid tissue*). Os linfomas MALT do estômago estão associados à infecção pelo *Hp* e são o modelo de estudo para todos os demais linfomas de mucosas. Dentre as neoplasias mesenquimais se destaca o tumor estromal do trato gastrointestinal (GIST, do inglês *gastrintestinal stromal tumor*). Estes tumores, a despeito de pouco frequentes, são extremamente importantes pela existência de uma mutação específica no gene *c-KIT* que é determinante na terapêutica com agente inibidor específico, o imatinib. O estômago é o sítio primário mais comum de GIST.

O AdG representa cerca de 90% das neoplasias gástricas e ocorre predominantemente em pacientes em idade mais avançada (FUJIMOTO et al. 1994). O desenvolvimento desta neoplasia parece resultar de uma combinação de fatores ambientais e o acúmulo de alterações genéticas específicas devido ao aumento da instabilidade genética (MILNE et al. 2006),

como será comentado adiante. O prognóstico é dependente de variáveis ligadas ao paciente, ao tratamento e à biologia do tumor (WERNER et al. 2001).

Diversas classificações histopatológicas para os AdG tem sido descritas, não havendo nenhuma universalmente utilizada. A classificação histopatológica mais tradicional e ainda bastante usada no mundo ocidental é aquela descrita por LAURÉN (1965). De acordo com essa, o AdG pode ser dividido em dois subtipos principais (intestinal e difuso), além de indeterminados (não-classificáveis). O AdG tipo difuso é caracterizado por células isoladas em meio a fibrose estromal. Ocorre mais frequentemente em pacientes mais jovens (menores que 60 anos), tem incidência similar na maioria dos países, localiza-se na região do corpo gástrico, tem aspecto macroscópico característico conhecido como “linitis plástica” e a disseminação é predominantemente peritoneal (FUCHS e MAYER 1995).

O AdG tipo intestinal se caracteriza pela formação de estruturas glandulares com diversos graus de diferenciação. Este é predominante em população masculina de idade mais avançada, mais frequentemente no antro gástrico, mais comum nos países com maior incidência e dissemina-se predominantemente para o fígado. As neoplasias que tem quantidades similares entre componentes difuso e intestinal são reconhecidos como AdG mistos (não contemplados na classificação de Laurén). Os tumores indiferenciados são melhor classificados como indeterminados na classificação de Laurén (LAURÉN 1965).

A classificação histopatológica mais recente da OMS prevê, além de

diversos tipos especiais, que os AdG usuais apresentam quatro padrões principais: papilífero, tubular, mucinoso e de células em anel de sinete (que inclui outros carcinomas de células isoladas). Esta classificação prevê também a possibilidade de um tumor ser misto (LAUWERS et al. 2010). Não é clara a superioridade deste sistema quando comparado ao de Laurén, mas há uma tendência de maior uso universal desta última. Outras classificações importantes do AdG incluem a de MING (1977) de GOSEKI et al. (1992) e a de CARNEIRO (1997).

Outras abordagens menos baseadas em diferenciação tumoral têm sido tentadas no sentido de definir melhor os grupos de risco. Há uma proposta recente em agrupar os AdG em 3 grupos, de acordo com o *tipo histológico*: Grupo I: tumor com intenso infiltrado inflamatório, padrão tubular e bem diferenciado, carcinoma difuso desmoplásico e adenocarcinoma muconodular; Grupo II: adenocarcinoma mucinoso SOE, adenocarcinoma coesivo SOE e carcinoma difuso; Grupo III: adenocarcinoma mucinoso de alto grau histológico e carcinoma anaplásico (CHIARAVALLI et al. 2012), Esta abordagem não foi ainda validada em outros estudos.

Embora indiscutivelmente todas as classificações tenham seu valor prático e biológico, é muito questionável a capacidade destas em predizer o prognóstico. Até se o AdG difuso tem prognóstico pior do que o AdG intestinal é motivo de debate na literatura, mesmo passados mais de 40 anos da descrição de Laurén. Aparentemente o fulcro desta discussão está que os carcinomas difusos tem diversos subtipos histológicos e variados aspectos clínicos que fazem que a simples denominação de carcinoma de células em

anel de sinete (CCAS) não seja o suficiente para estabelecer a provável evolução clínica.

A avaliação da série histórica do A.C.Camargo Cancer Center demonstra que nos casos tratados entre 1988-98 (446 pacientes), não houve nenhuma diferença na taxa de mortalidade câncer-específica entre os AdG tipo intestinal e do tipo difuso (SILVA 2005). Aparentemente os casos de AdG do tipo difuso que ocorrem em crianças e jovens são bastante agressivos, mas esta publicação é anterior ao conhecimento da síndrome de AdG familiar (UMEYAMA et al. 1982). Há CCAS que são reconhecidos como de baixo grau histológico e aqueles de alto grau histológico, com células anaplásicas (CHIARAVALLI et al. 2009).

Estudando tumores precoces, HUH et al. (2013), demonstraram que os tumores com achados histopatológicos mistos estiveram mais associados a metástases linfonodais. Outros aspectos têm sido lembrados como de importância para discriminar o prognóstico do AdG CCAS, tais como a presença de infiltrado inflamatório linfocitário (LEE et al. 2008; HAAS et al. 2009; HUANG et al. 2009) de células T regulatórias (menos metástases linfonodais) e reação desmoplásica (indicativa de disseminação peritoneal) (HUANG et al. 2009). Também é importante diferenciar o CCAS do carcinoma mucinoso, pois este último é mais agressivo (BU et al. 2013).

Os AdG do tipo difuso e intestinal têm diversas diferenças na expressão de marcadores, perfil de metilação (FERRASI et al. 2010) e assinaturas gênicas, além das já comentadas em termos de apresentação clínica e morfológica, o que demonstram que são doenças diferentes. Dentre os

biomarcadores que demonstram esta diferença estão a E-caderina (ALMEIDA et al. 2010), IGFBP-3 (GIGEK et al. 2010), via extrínseca da apoptose (GOMES et al. 2011), marcadores de células tronco (DHINGRA et al. 2011), proteína p53 (GONÇALVES et al. 2011) e HER2/neu (GÓMEZ-MARTINS et al. 2012; KIM et al. 2012; KATAOKA et al. 2013), entre outros. Este aspecto somado aos comentados anteriormente cria um paradoxo no estudo do AdG pois a despeito de muito se descrever sobre a patogênese molecular há poucos estudos que podem ser comparáveis devido a heterogeneidade dos critérios de inclusão destes estudos.

### **1.3 ESTADO ATUAL DO CONHECIMENTO DA PATOGÊNESE COM ÊNFASE AO CONHECIMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR/CELULAR DO CÂNCER GÁSTRICO**

O AdG é resultado da ação de diversos mecanismos causais e da interação entre eles. Dentre os fatores que participam estão a suscetibilidade genética do hospedeiro e fatores exógenos do ambiente (dieta, tabaco e álcool) em uma mucosa inflamada. Esta última é geralmente causada pela infecção crônica pelo *Hp*. As evidências que correlacionam o *Hp* com o AdG incluem estudos epidemiológicos em diversas populações ao redor do mundo, alterações morfológicas da mucosa que precedem o AdG e estão associadas à infecção, o desenvolvimento de modelos animais e dados epidemiológicos demonstrando que a erradicação da infecção reduz as taxas de desenvolvimento do AdG. Os tumores que se desenvolvem após a



erradicação da infecção pelo *Hp* são caracteristicamente de áreas não-secretoras (IIJIMA et al. 2012). Os mecanismos que fazem a ponte causal entre os processos inflamatórios e o desenvolvimento de neoplasias no trato gastrintestinal foram revistos recentemente por CHIBA et al. (2012).

Mais recentemente o grupo *Cancer Genome Atlas Research Network* (2014) (TCGA) publicou a caracterização molecular dos carcinomas gástricos. Neste trabalho os autores utilizaram 295 casos de AdG e descreveram quatro tipos moleculares: associados à infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV, do inglês *Epstein-Barr vírus*), tumores com instabilidade de microssatélites, tumores com genoma estável e tumores com instabilidade cromossômica. Estes corresponderam a cerca de 9%, 22%, 20% e 50% dos casos estudados, respectivamente.

Estes subtipos moleculares apresentaram algumas diferenças clínicas. Por exemplo, os tumores com instabilidade de microssatélites estão frequentemente localizados no cárdia, acometem pacientes mais velhos e predominam no gênero feminino. Os tumores identificados como o de genoma estável eram predominantemente do tipo difuso de Laurén, de pacientes mais jovens e mais localizados no fundo e antro gástrico. Aqueles com alta instabilidade cromossômica eram de pacientes com mediana de 70 anos e predominando com alta frequência relativa na junção cárdio-esofágica e cárdia. Os tumores associados ao EBV estiveram mais presentes no fundo e corpo gástrico e foram mais frequentes em homens. Embora estas predominâncias demográficas existam, nenhuma delas é absoluta para se determinar o subtipo molecular baseando-se em localização, tipo histológico,

idade e gênero, uma vez que há uma marcada sobreposição entre todos os grupos.

#### **1.4 ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS ASSOCIADOS À INFECÇÃO PELO VÍRUS DE EPSTEIN-BARR**

Conforme conhecido há décadas e agora confirmado pelo estudo recente do TCGA, uma pequena parcela de cerca de 10% dos casos de ADG está associada ao vírus de EBV. Em nosso meio, o adenocarcinoma associado ao EBV (AdG-EBV) é encontrado entre 4,7-12% dos casos (LOPES et al. 2004; BEGNAMI et al. 2006; LIMA et al. 2008; FERRASI et al. 2010). Um trabalho brasileiro que destoa desta frequência foi conduzido em Manaus, onde 8/10 casos testados foram positivos para EBV (DE AQUINO et al. 2012). Em outras partes do mundo ele corresponde a 18% dos casos na Alemanha, 16% nos Estados Unidos, 17% no Chile e 7% no México (HERRERA-GOEPFERT et al. 2005; CHEN et al. 2012). Em uma meta-análise os AdG-EBV correspondem a 9,9% dos casos nas Américas, 9,2% na Europa e 8,3% na Ásia, alterando a noção que seria uma doença predominantemente oriental (MURPHY et al. 2009). Esta prevalência faz com que tenhamos cerca de 80.000 casos novos de AdG EBV-relacionados no mundo, tornando esta neoplasia mais frequente do que a associação com carcinoma nasofaríngeo e linfoma de Hodgkin (CHEN et al. 2012).

O AdG-EBV é uma entidade clínico-patológica particular. Este tipo de neoplasia afeta preferencialmente homens, é usualmente localizado no

estômago proximal, ocorre em pacientes com faixa etária um pouco mais baixa e é proporcionalmente mais frequente nos pacientes previamente gastrectomizados (MURPHY et al. 2009; CHEN et al. 2012). Este conhecimento clássico da localização não foi demonstrado no estudo molecular do TCGA, onde os tumores estiveram mais frequentemente localizados no corpo e antro gástrico. Eles têm índice relativamente menor de comprometimento linfonodal e prognóstico mais favorável (KORIYAMA et al. 2002), embora nem todos os artigos assim o demonstrem (KIJIMA et al. 2003; CHEN et al. 2012). Histologicamente podem se apresentar como um tumor sólido “linfoepitelioma-símile” (CHETTY 2012) ou do tipo de AdG intestinal usual (LOPES et al. 2004). Geralmente são acompanhados de infiltrado inflamatório linfocitário denso, sendo este estroma linfoide praticamente patognomônico da infecção pelo EBV (CHAPEL et al. 2000; CHANG et al. 2000). Este infiltrado é predominantemente composto por células T CD8+, cuja intensidade está também associada a melhor evolução clínica, embora nem todos os autores assim o confirmem (KIJIMA et al. 2003).

A patogênese está associada à reativação da infecção latente dos linfócitos B e posterior infecção das células epiteliais. Estas células epiteliais têm uma expansão clonal e passam a ter características especiais que levam ao fenômeno de transição epitélio-mesênquima e resistência à apoptose. As células passam a secretar moléculas imunomoduladoras que seriam responsáveis pela intensa resposta inflamatória associada. Além disso, as células dos AdG-EBV têm significativamente maior capacidade de expressar óxido nítrico (NOS2), que aumentaria o dano celular pela produção de

espécies reativas de oxigênio (BEGNAMI et al. 2006). Há autores que propõem que os AdG-EBV intestinal têm patogênese diferente daqueles difusos (KORIYAMA et al. 2004).

Há evidências que um dos principais mecanismos de progressão neoplásica destes tumores é a capacidade das células de evadirem à apoptose (KUME et al. 1999; ISHII et al. 2004). Os AdG-EBV tem maior expressão de Bcl-2 e menor expressão da BAK (KUME et al. 1999; BEGNAMI et al. 2006), embora estes resultados não tenham sido reproduzidos por outros autores (ISHII et al. 2001; LIMA et al. 2008). São geralmente negativos para p53, p16, p27 e p21 (CHAPEL et al. 2000). Os estudos moleculares mais abrangentes são ainda escassos e conflitantes e, portanto, há muito que se investigar neste tipo de AdG (CHEN et al. 2012). No artigo do TCGA, estes AdG foram caracterizados por hipermetilação do DNA extrema, mutações de *PIK3CA* e amplificação de *JAK2*, *PD-L1* e *PDCD1LG2*.

A hipermetilação dos promotores nos AdG-EBV foi bastante mais frequente do que naqueles casos com instabilidade de microssatélites (TCGA 2014). Em todos os casos da casuística, o gene p16 esteve metilado, enquanto que metilação de *MLH1* não foi observada. Perda da expressão proteica de p16 nos ADG-EBV+ havia sido anteriormente mostrada por LEE et al. (2004). ZAZULA et al. (2006) demonstraram que em cinco casos de ADG-EBV o gene *CDH1* que codifica E-caderina, se encontrava metilado, enquanto que os casos AdG-não-EBV relacionados tinham hipermetilação em cerca de 50% dos casos. Entretanto, a relação desta perda de expressão de

E-caderina e a presença de transição epitélio mesênquima não foi anteriormente demonstrada.

## **1.5 OS RECEPTORES DE CHECK-POINT (PD-L1)**

A ativação de células T e sua consequente expansão é um processo complexo regulado por um conjunto de vias sinalizadoras. Essa ativação e expansão ocorrem após a ligação de peptídeos antigênicos com os receptores das células T (TCRs). Esses peptídeos, por sua vez, são processados e apresentados às células T através de células apresentadoras de antígenos (CAP), como as células dendríticas, num processo conhecido como apresentação antigênica. As células apresentadoras de antígeno, reconhecem os antígenos patogênicos, os capturam e os processam, os transformando em peptídeos menores que se ligam às moléculas do complexo maior de histocompatibilidade e são expostos na superfície celular para serem reconhecidos pelas células T. Após a ligação com o receptor de células T, o primeiro sinal de ativação é fornecido (sinal 1). No entanto, a célula T necessitará de um segundo sinal co-estimulatório para fugir da anergia ou apoptose (CURTSINGER et al. 2003a).

Possivelmente o mais importante sinal co-estimulatório é feito através da ligação do CD80 das células dendríticas com o CD28 nas células T. Há ainda, um terceiro sinal através de citocinas, que vão regular as atividades efetoras e a diferenciação das células T (CURTSINGER et al. 2003b). A interação de sinais ativadores e sinais inibitórios entre as células

apresentadoras de antígenos e as células T vão determinar e modular a intensidade e duração da resposta imune.

Após anos de extensiva pesquisa, a imunoterapia finalmente tem alcançado um papel de destaque no tratamento do câncer com resultados cada vez mais promissores. Uma das principais abordagens se faz no bloqueio de pontos de controle da resposta imunológica e esta abordagem rendeu o Prêmio Nobel de Medicina em 2018 aos doutores ALLISON e HONJO (2018).

A resposta imunológica e o reconhecimento antigênico pelas células T é altamente regulada por sinais co-estimulatórios positivos e negativos. Em condições normais, os sinais negativos, também conhecidos como pontos de checagem (“checkpoints”) são fundamentais para manutenção da tolerância imunológica e proteção contra autoimunidade. Em tumores os ligantes e seus receptores inibitórios podem se encontrar hiperativados, inibindo a atuação do sistema imunológico na destruição das células tumorais (ZUAZO et al. 2017).

Dentre os principais sinais negativos de relevância clínica estão a interação PD-L1 (“programmed cell death ligand 1”)-PD1 (“programmed cell death-1”) e CD80-CTLA4. PD1 é uma proteína transmembrana expressa em células imunes efetoras e sua expressão encontra-se aumentada após ativação de células B e T. Seu receptor, o PD-L1, é um membro da família B7 de moléculas co-estimuladoras/co-inibidoras, sendo expresso em várias células, incluindo células dendríticas e células cancerígenas. (SHARPE et al. 2007). Em diversos tipos de células cancerígenas podem ocorrer hiperexpressão de PD-L1, levando a um mecanismo de resiliência

imunológica (KONISHI et al. 2004; DONG et al. 2002). O PD-L1 na superfície das células cancerígenas se liga ao PD1 nas células T e provoca inativação de células T no microambiente tumoral (FREEMAN et al. 2000).

A aplicação de anticorpos monoclonais anti-PDL1/PD1 tem demonstrado eficácia clínica em diversos tipos de câncer humano. Vários estudos clínicos demonstraram que o bloqueio PDL1/PD1 é mais eficaz que a terapia convencional, com resposta clínica mais duradoura e com menos efeitos adversos (GATO-CAÑAS et al. 2016).

### **1.5.1 Mecanismos de apresentação antigênica às células T**

A ativação de células T é um mecanismo altamente regulado em múltiplos passos, especialmente durante a apresentação antigênica, para garantir uma resposta imunológica adequada. As células T reconhecem os peptídeos antigênicos através dos receptores de superfície de células T (TCR). Ocorre a formação de uma sinapse imunológica entre os receptores de células T e os peptídeos antigênicos processados e expressos no complexo maior de histocompatibilidade (p-MHC) das células apresentadoras de antígenos. Essa sinapse é estabilizada/regulada por sinais positivos e negativos gerados entre as células T e as células apresentadoras de antígenos.

A contribuição de fatores co-estimuladores e fatores inibitórios vai determinar o estado de ativação e o tipo de resposta das células T (GREENWALD et al. 2005; ZOU e CHEN 2008). O principal sinal positivo para a ativação das células T é a ligação do CD80 das células apresentadoras de

antígeno ao CD28 das células T. Os sinais inibitórios (“checkpoints” imunes) atuam no controle e modulação da resposta imune garantindo a tolerância e proteção contra respostas imunológicas exacerbadas (NURIEVA et al. 2006). O CTL4 (“T-lymphocyte-associate antigen 4”) e PD1 presentes nas células T, se ligam ao CD80 e ao PDL1 nas células apresentadoras de antígeno/células cancerígenas, respectivamente e exercem um efeito inibitório à resposta imune. Algumas citocinas ainda exercem efeitos sobre a diferenciação e ativação das células T.

As cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do receptor de células T (TCR) associadas à molécula de CD3 reconhecem o p-MHC juntamente com agrupamentos CD4 ou CD8 e um sinal complexo é iniciado. Então, ocorrem recrutamento e ativação de tirosinas quinases Src like, como as LCK. Estas, por sua vez, fosforilam o TCR e CD28 em seus domínios intracitoplasmáticos (CHAN et al. 1992). Há recrutamento de ZAP70 e PI3K e ligação ao CD3 $\zeta$  e posterior fosforilação de LAT e p38. Há recrutamento de outras moléculas tais como GRB2, VAV e SOS culminando na ativação da MAPK, ERK e JNK (SIEH et al. 1994; TYBULEWICZ 2005; ROUND et al. 2007). PLC $\gamma$ 1 também torna-se ativado causando a liberação de íons Ca<sup>2+</sup> do retículo endoplasmático e NFAT (“nuclear fator of activated T-cells) e translocação de CREB para o núcleo. Isoformas de PKC são ativadas e participam na via de NF-Kappa-B (TYBULEWICZ 2005). Estes eventos induzem a ativação de RasGRP1 que por sua vez ativa a ERK (BIVONA et al. 2003).

Um segundo sinal co-estimulatório é dado pela interação entre CD80 e CD28 reforçando a ativação de células T. Essa interação (CD80-CD28)



recruta PI3K para o domínio intracitoplasmático do CD28, tornando-o ativado e induzindo a produção de fosfatidilinositol[3, 4, 5]-trifosfato (PIP<sub>3</sub>), o qual será necessário para ativação de AKT e PKC $\theta$  e posterior expressão de Bcl-x. Através da via mTOR, AKT resgata as células T da anergia (SALVADOR et al. 2005), enquanto o PKC $\theta$ , através da ativação de NF- $\kappa$ B e MKK7, induzem a produção de Il-2.

### **1.5.2 Mecanismos PD1 dependentes de supressão de células T**

Durante a apresentação antigênica, a interação PDL1-PD1 na sinapse imunológica bloqueia a ativação, proliferação e aquisição de capacidades efetoras das células T (RILEY et al. 2009) através da inibição forte da transdução de sinais do TCR e da co-estimulação CD28-CD80 (BOISE et al. 1995).

PD1 é constituído por um domínio N-terminal de região variável de imunoglobulina-símile, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático contendo sinais baseados em tirosina (tyrosine-based signal motifs). Nestes, estão incluídos um imunoreceptor inibitório baseado em tirosina (“immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif – ITIM”) e um imunoreceptor baseado em tirosina switch motif (immunoreceptor tyrosine-based switch motif – ITSM). Todos os estudos apontam para o ITSM como o mediador das atividades inibitórias do PD1 (CHEMNITZ et al. 2004).

PD1 exerce sua função imunossupressora através do recrutamento, para os domínios baseados em tirosina, de fosfatases contendo domínio, SHP1 e SHP2 (NEEL et al. 2003). Quando ocorre ativação de sinais de

transdução do TCR durante a apresentação e reconhecimento antigênico pelas células T, ocorre fosforilação de várias moléculas pela LCK. Se nessa situação ocorrer a ligação de PD1 ao seu receptor PDL1, o sinal de transdução do TCR vai se encerrar através de vários mecanismos. O primeiro consiste na desfosforilação mediada por SHP de componentes do sinalossomo (“signalosome”) do TCR (FREEMAN et al. 2000).

Ocorre desfosforilação do CD3 $\zeta$ , ZAP70 e da quinase PI3K, resultando na desativação da cascata de sinais dessas vias (SHEPPARD et al. 2004; PATSOUKIS et al. 2012a). Apesar de ambas as moléculas SHP1 e SHP2 poderem interagir com ITSM (CHEMNITZ et al. 2004), tem-se demonstrado que apenas a SHP2 se liga ao ITSM durante a ativação de células T (SHEPPARD et al. 2004). E, ainda, apenas SHP2 foi associada em microagrupamentos com PD1 (YOKOSUKA et al. 2012). Portanto, a maioria das evidências apontam para o SHP2 como principal mediador do efeito inibitório do PD1, enquanto a real atuação do SHP1 ainda é discutível. PD1 também pode exercer ação inibitória sobre a ativação de células T através de mecanismos indiretos, a maioria deles afetando a proliferação de células T. Os sinais de transdução do TCR aumentam a expressão de CDK2 que fosforilam o domínio regulatório do PTEN, que por sua vez inibe a atividade de fosfatase sobre o PIP<sub>3</sub>, produzido pela PI3K (TORRES et al. 2001). Com a atuação do PD1, a expressão de CDK2 é reduzida e o PTEN pode finalizar as atividades da via PI3K através da desfosforilação do PIP<sub>3</sub> (PATSOUKIS et al. 2013).

PD1 também inibe as quinases ciclina dependentes, resultando em inibição da proliferação de células T. Isso se faz através da inibição da transcrição de SCF<sup>skp2</sup> em decorrência da inibição do AKT e ERK. A SCF<sup>skp2</sup> é uma ubiquitina ligase que tem como alvo o inibidor de CDK2, p27<sup>Kip1</sup>, promovendo sua degradação proteossomal. Na ausência de SCF<sup>skp2</sup>, o p27<sup>Kip1</sup> se acumula e inibe a divisão celular (PATSOUKIS et al. 2012b). Esse mecanismo é reforçado através da ausência de fosforilação inibitória SMAD3 CDK2 dependente. SMAD3 ativa o genes que inibem a ação da CDK4, CDK6, como o p15<sup>INK4B</sup> e reprime a transcrição de CDC25A, que normalmente remove fosforilações inibitórias da CDK4, CDK6 e CDK2 (PATSOUKIS et al. 2012b). A função inibitória do PD1 é um mecanismo complexo que envolve a várias vias de sinalização (WEI et al. 2013).

PD1 também pode controlar a expressão de TCR na superfície celular impedindo o reconhecimento do pMHC pelas células T. Apesar desse mecanismo de controle não ser bem conhecido, estudos apontam para a participação de ubiquitinas ligases E3 como os principais mediadores desse controle mediado por PD1. Especialmente a família CBL de ubiquitinas ligases E3 desempenham um papel crítico na regulação da expressão de TCR durante a exposição antigênica (NARAMURA et al. 2002; KARWACZ et al. 2011). Tem se demonstrado que CBL-B e ITCH causam ubiquitinação de cadeias do CD3 e do CD28 prevenindo a sua fosforilação e associação a quinases relacionadas a TCR, como ZAP-70 e PI3K (HUANG et al. 2010) (FANG e LIU 2001). A interação PDL1-PD1 durante a apresentação antigênica pelas células dendríticas às células T causa um aumento da

expressão de CBL-b e c-CBL os quais contribuem para modulação do TCR (NURIEVA et al. 2006; KARWACZ et al. 2011). Este processo ocorre também no microambiente tumoral, onde o PD1 é fortemente expresso em células T intratumorais e geralmente há baixa da expressão de TCR na superfície dessas células T (CRESPO et al. 2013, CHOU e EFFROS 2013).

Com a ativação de células T há uma reprogramação metabólica para suprir os altos níveis de energia necessários. Na fase quiescente, as células T usam a degradação de lipídios como fonte de energia. Glicólise aeróbica torna-se a fonte dominante de energia em células T efetoras e há um incremento da utilização de glutamina. Com a ação do PD1 ocorre uma supressão do consumo de oxigênio e a glicólise aeróbica não é mais utilizada e as células passam a utilizar a oxidação lipídica como principal fonte de energia (RATHMELL et al. 2000; PATSOUKIS et al. 2015). PI3K-AKT e ERK induzem a expressão de genes da glicólise, portanto a mudança do padrão de metabolismo pode estar relacionada ao efeito inibitório do PD1 sobre essas vias de sinalização (PATSOUKIS et al. 2015). Como consequência do metabolismo de ácidos graxos induzido pelo PD1, ocorre acúmulo de espécies reativas de oxigênio, criando, portanto, um ambiente oxidativo (TKACHEV et al. 2015). Dessa forma, o PD1 causa uma mudança na programação metabólica de um fenótipo de célula T efetora para um fenótipo de célula T quiescente (fenótipo de célula T de memória). Essas alterações metabólicas têm uma participação importante na supressão de células T PD1 dependentes no câncer (BOUSSIOTIS et al. 2016).

## **1.6 EXPRESSÃO DE PD-L1 e de p16 E OS ADG ASSOCIADOS À EBV**

Com todo este conhecimento emergente, apresenta-se uma grande oportunidade para se entender os AdG-EBV, uma vez que estes são usualmente associados a resposta inflamatória exuberante (SHINOZAKI-USHIKU et al. 2015).

Os AdG-EBV têm duas formas histopatológicas: aqueles convencionais e os “linfoepitelioma-like”, embora possa ser visto, na verdade, um espectro entre eles. Alguns autores creem em um terceiro subtipo, com infiltrado que lembra a doença de Crohn (NASEEM et al. 2018). Este último é também conhecido como AdG com estroma linfóide e o infiltrado inflamatório pode ser tão intenso de modo a mascarar as células tumorais. Quando nos deparamos com esta morfologia, a demonstração da presença do EBV é mandatória, pois dentre estes cerca de 80% são AdG-EBV (SHINOZAKI-USHIKU et al. 2015).

No Brasil, RAMOS et al. (2017) encontraram sete casos dentre 255 AdG e seis deles eram AdG-EBV; o sétimo tinha instabilidade de microssatélites (RAMOS et al. 2017). A outra variante histológica não permite a suspeição que se trate de um AdG-EBV pois se apresenta como um AdG moderadamente diferenciado, cribriforme com variável quantidade de infiltrado inflamatório.

A expressão de PD-L1 em AdG, em virtude do advento da imunoterapia, tem sido melhor pesquisada mais recentemente. Ainda é difícil comparar os artigos pois há uma grande variedade de métodos e diferentes

anticorpos. Aparentemente, a expressão é mais comum nos AdG-EBV e naqueles do segundo tipo molecular, os associados com a instabilidade de microssatélites (MA et al. 2016).

Há cifras tão altas quanto a de 93% dos AdG-EBV também PD-L1 positivos (DONG et al. 2016), mas estes autores utilizaram um anticorpo policlonal onde ainda não havia padronização da análise do teste. Este número se contrasta com o publicado por PEREIRA et al. (2018) onde, dentre 285 casos, somente 25 (8,8%) eram positivos para PD-L1. Mais da metade destes casos eram AdG-EBV e não houve diferenças em relação à instabilidade de microssatélites (PEREIRA et al. 2018). A literatura em relação a expressão de PD-L1 e AdG tem aumentado significativamente e a Tabela 2 resume alguns dos artigos mais recentes e a frequência de casos PD-L1 positivos.

A proteína p16 é um produto do gene CDKN2A e exerce uma ação importante na regulação negativa do ciclo celular ao inibir a D-CDKN4. Sua expressão e participação no desenvolvimento do carcinoma gástrico associado à EBV tem sido sugerida por alguns autores, demonstrando taxas de expressão de p16 de até 81,5% nos carcinomas EBV-positivos (OJIMA et al. 2006; WANG et al. 2008). Já outros estudos obtiveram resultados contrários, com uma menor expressão desse marcador nestes tumores (LEE et al. 2004). O estudo do TCGA demonstrou hipermetilação do promotor do gene CDKN2A em todos os casos de Adg-EBV.

**Tabela 2** - Resumo da frequência da expressão de PD-L1 em AdG.

<b>AUTOR</b>	<b>ANO</b>	<b>CASOS</b>	<b>ANTICORPO</b>	<b>% DE CASOS PD-L1+</b>
<b>DONG et al.</b>	2016	855	58810 (abcam)	93%
<b>KIM et al.</b>	2019	139	SP142 (Spring Bioscience)	30%
<b>KOH et al.</b>	2017	392	E1L3N (Cell Signaling)	25%
<b>MA et al.</b>	2016	44	SP263 (Ventana)	72%
<b>OKI et al.</b>	2017	144	27A2 (lifespan)	45%
<b>PEREIRA et al.</b>	2018	287	28-8 (abcam)	8,8%
<b>SAITO et al.</b>	2016	96 (AdG-EBV)	E1L3N (Cell Signaling)	34%
<b>SEO et al.</b>	2017	116 (AdG-EBV)	E1L3N (Cell Signaling)	50%
<b>WEN et al.</b>	2017	166	557924 (BD)	22%

## 2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

1. Conhecer a frequência de ADG-EBV na amostra diagnosticada e tratada na Liga Contra o Câncer do Rio Grande do Norte, caracterizando-os clinicopatologicamente e em relação ao seu infiltrado inflamatório.
2. Estabelecer a frequência de casos de expressão positiva para PD-L1, medido pelo CPS aprovado para a indicação terapêutica.
3. Avaliar a resposta imune de linfócitos CD4+ e CD8+ na amostra do estudo
4. Comparar os AdG-EBV e os AdG-não-EBV em relação aos aspectos clinicopatológicos, frequência de expressão de PD-L1 e composição da resposta imune T CD4 e CD8.
5. Testar a possibilidade de usar a expressão imuno-histoquímica de p16 como marcador indicador da infecção pelo EBV nos AdG.



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES**

Trata-se de um estudo retrospectivo, observacional, clínico-patológico e imuno-histoquímico de AdG primário de pacientes diagnosticados, tratados e em acompanhamento na Liga Contra o Câncer do Rio Grande do Norte, as quais preencheram os critérios de elegibilidade.

Para o presente trabalho foram selecionados, retrospectivamente 288 casos consecutivos de carcinomas gástricos submetidos à gastrectomia durante o período de janeiro de 2003 a janeiro de 2014, obtidos dos arquivos do laboratório de anatomia patológica da Liga contra o câncer do Rio Grande do Norte. Os prontuários médicos disponíveis e/ou os laudos anátomo-patológicos do laboratório de patologia correspondentes foram revisados, onde foram obtidas informações de idade dos pacientes, localização do tumor e status linfonodal. Procedeu-se a avaliação dos achados anatomopatológicos por dois patologistas, incluindo tipo histológico, profundidade de invasão, tamanho do tumor, presença de invasão vascular e perineural. Os blocos de parafina foram resgatados dos arquivos da Anatomia Patológica. Foram selecionados casos que dispunham de quantidade suficiente de material tumoral conservado em parafina para as colorações pelo método de imunohistoquímica. Dos 288 casos, um caso foi excluído por

tratar-se de carcinoma escamoso e 18 casos não apresentaram material suficiente para realização do TMA, totalizando, portanto 269 casos.

### **3.2 ASPECTOS ÉTICOS**

O presente projeto é parte do grande projeto temático de câncer gástrico do A.C.Camargo Cancer Center/CIPE submetido e aprovado pelo Comitê de ética da instituição, sob o processo N° 2134/15, aprovado em 08/12/2015. (Anexo 1)

### **3.3 CONSTRUÇÃO DO TMA**

As áreas do tumor foram selecionadas em lâminas de rotina e amostradas em novos blocos de parafina. Cilindros de 1,0 mm da área tumoral obtidos pelo dispositivo técnico *Tissue Microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Springs, EUA) foram transferidos em duplicata para o novo bloco com posição bidimensional separados por espaços de 0,2 mm, determinados e gravados pelo equipamento. Deste novo bloco, chamado receptor, foram obtidos cortes histológicos realizados com micrótomo manual e transferidos para lâminas eletricamente carregadas. Os detalhes da construção destes micro-arranjos de tecido foram revistos por ANDRADE et al. (2007).

No total, os 269 casos foram distribuídos em dois blocos com 135 e 134 casos respectivamente. Os casos foram colocados em duplicata permitindo a análise de duas regiões diferentes de cada tumor.

### **3.4 DETECÇÃO DA INFECÇÃO PELO EBV POR HIBRIDAÇÃO IN SITU**

Foram realizados cortes histológicos dos blocos de TMA de 5-6  $\mu\text{m}$  de espessura e lâminas com amostras do tumor foram preparadas para hibridização “in situ” com probe para EBER-1 de oligonucleotídeo conjugado com fluoresceína (Novocastra, Newcastle- Upon- Tyne, U.K). Logo após desparafinização e desidratação, as secções foram tratadas com proteinase K (Sigma, St. Louis, MO) durante 15 minutos, à temperatura de 37°C. Após lavagem e desidratação, o probe conjugado FITC foi aplicado e hibridizado durante a noite, à temperatura de 37°C. A hibridização foi detectada em seguida através de anticorpo de coelho anti-FITC conjugado com fosfatase alcalina (novocastra) durante 30 minutos, em temperatura ambiente. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayer. Nos controles negativos o probe EBER-1 não foi aplicado.

### **3.5 DETECÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA POR IMUNOHISTOQUÍMICA**

Cortes histológicos dos blocos parafina foram submetidos à análise por imuno-histoquímica utilizando sistema automatizado Ventana Ultra (Ventana Medical Systems; Tucson, AZ, USA). Os anticorpos podem ser vistos na Tabela 3.

**Tabela 3** - Anticorpos utilizados nesta investigação.

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Fabricante/distribuidor</b>	<b>Diluição</b>
PD-L1	SP263	Ventana/Roche	PD
CD4	SP35	Ventana	PD
CD8	SP57	Ventana	PD
p16	E6H4	Ventana	PD

Os resultados foram analisados em microscópio óptico por dois observadores e o resultado obtido pelo consenso. Para o estabelecimento da expressão de PD-L1 foi utilizado a metodologia aprovada para o câncer gástrico, que é o CPS maior ou igual a 1. A estimativa de positividade e negatividade dos anticorpos CD4, CD8 e p16 foi baseada na observação dos casos. Sendo que para os anticorpos CD4 e CD8 foram estimados os números de linfócitos positivos e categorizados através de percentual em relação ao estroma e células tumorais, sendo considerado positivos acima de 10%. E para a análise de p16 foi considerado positivo os casos com expressão forte a moderada presente em 30% ou mais das células tumorais. A estimativa de positividade e negatividade dos anticorpos CD4, CD8 e p16 foi baseada na observação dos casos.

### **3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o Prisma 4, realizando-se o Teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e Teste Exato de Fisher para as avaliações de associação entre variáveis qualitativas.

Foram considerados estatisticamente significantes, valores de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA E ANATOMOPATOLÓGICA

Dos 269 casos avaliados 17 (6,32%) apresentaram relação com EBV. Neste grupo a idade variou de 36 a 87 anos, com média de 59 anos e com mediana de 52 anos. Houve predomínio de casos em pacientes com mais de 50 anos (60%). Dezesesseis casos ocorreram no sexo masculino e apenas 1 no sexo feminino. Os subtipos histológicos mais frequentes foram o adenocarcinoma misto (intestinal e difuso) e o tipo difuso, com 6 casos cada (35,3%), o tipo intestinal com 4 casos (23,5%). Um caso foi classificado como carcinoma adenoescamoso (5,9%) (Tabela 3). Sete casos (41,2%) estavam localizados no corpo, enquanto que 5 casos (29,4%), no antro e 5 casos (29,4%) na transição corpo/antro. A grande maioria (88%) encontrava-se no estágio pT4 (15/17) e com linfonodos regionais positivos (12/17).

**Tabela 4** - Subtipos histológicos de adenocarcinomas gástrico EBV positivos.

Tipo histológico	Nº de casos	%
Misto	6/17	35,3
Difuso	6/17	35,3
Intestinal	4/17	23,5
Adenoescamoso	1/17	5,9

Os casos de adenocarcinomas não associados EBV (AdG-não-EBV) totalizaram 252 (93,68%). A idade variou de 17 a 91 anos, com média de 63 anos e mediana de 62 anos. Houve um ligeiro predomínio no sexo masculino (M:F=1,2:1). O subtipo histológico misto (intestinal + difuso) foi o mais frequente com 90 casos (35,7%), seguido pelo tipo intestinal, 87 casos (34,5%) e o tipo difuso, 75 casos (29,8%) (Tabela 4). A localização mais frequente foi o antro 141 casos (56%), seguido pelo corpo, 52 casos (20,6%), 49 casos (19,4%) na transição corpo/antro e 10 casos (4%) na transição cárdia/corpo. A maior parte dos tumores apresentaram estadiamento patológico pT4a (63,1%) e linfonodos regionais positivos estavam presentes em 165 casos (65,4%).

**Tabela 5** - Subtipos histológicos de adenocarcinomas gástrico EBV negativos.

Tipo histológico	Nº de casos	%
Misto	90/252	35,7
Intestinal	87/252	34,5
Difuso	75/252	29,8

## 4.2 RESULTADOS EM RELAÇÃO AOS MARCADORES

Do total de 269 casos, foram encontrados 68 casos positivos para PD-L1 (25,65%). A positividade para p16 foi observada em 177 casos (65,79%), para CD4 em 199 casos (74,72%) e para CD8 em 150 casos (56,5%). (Tabela 5)

**Tabela 6** - Expressão de PD-L1, CD4, CD8, p16 em adenocarcinomas gástricos.

Marcador	Nº de casos	%
PD-L1	69/269	25,65
CD4	201/269	74,72
CD8	152/269	56,50
p16	177/269	65,79

Nos adenocarcinomas EBV-positivos (AdG-EBV), a positividade para PD-L1 foi observada em 82,35% (14/17) e em todos os casos o infiltrado de células T CD4+ e CD8+ foi positivo (17/17). A expressão de p16 foi positiva em 35,29% dos casos (6/17).

No grupo de AdG-não-EBV, foi observada positividade para PD-L1 em 21,84% dos casos (55/252), para p16 em 67,86% (171/252), para CD4, 73,02% (184/252) e para CD8, 53,47% (135/252).

#### **4.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS ADG-EBV VERSUS OS ADG NÃO-RELACIONADOS AO EBV**

A frequência de AdG-EBV em pacientes abaixo de 50 anos foi de 40% (4/10) e de 60% em pacientes acima de 50 anos (6/10). No grupo de AdG-não-EBV, a frequência de pacientes abaixo de 50 anos de idade foi de 21,89% (44/201) e 78,11% (157/201). Não houve diferença estatisticamente significativa de ocorrência entre casos com idade igual ou menor ou acima de 50 anos entre os dois grupos ( $p=0,1824$ ) (Tabela 6).

**Tabela 7** - Distribuição dos casos EBV+/EBV- em relação a distribuição da idade

	Menor/Igual que 50 anos	Maior de 50 anos	Total
EBV+	4 (40%)	6 (60%)	10
EBV-	44 (21,89%)	157 (78,11%)	201
Total	48 (22,75%)	163 (77,25%)	211

$p=0,1824$

O acometimento linfonodal foi de 84,03% no grupo de AdG-EBV e de 65,48% no grupo de AdG-não-EBV, não demonstrando diferença estatisticamente significativa entre eles ( $p=0,7951$ ) (Tabela 7).

**Tabela 8** - Distribuição dos casos EBV+/EBV- em relação a estágio linfonodal.

	N0	LN+	Total
EBV+	5 (15,07%)	12 (84,03%)	17
EBV-	87 (34,52%)	165 (65,48%)	252
Total	77 (26,62%)	177 (65,8%)	269

$p=0,7951$

Não houve diferença estatisticamente significativa com relação ao estadiamento T, tendo sido observado, nos dois grupos, um maior número de casos nos estádios T3 e T4 (Tabela 8).



**Tabela 9** - Distribuição dos casos EBV+/EBV- em relação a estágio T.

	T1/T2	T3/T4	Total
EBV+	1 (5,88%)	16 (94,12%)	17
EBV-	55 (20,4%)	180 (79,6%)	235
Total	56 (21,83%)	197 (78,17%)	252

$p=0,137$

No grupo de AdG-EBV, a positividade para PD-L1 foi observada em 82,35%, enquanto no grupo de AdG-não-EBV esteve presente em 21,84%. A expressão de PD-L1 foi maior e estatisticamente significativa no grupo de AdG-EBV ( $p<0,0001$ ) (Tabela 9).

**Tabela 10** - Distribuição dos casos EBV+/EBV- em relação à expressão de PD-L1+.

	PD-L1-	PD-L1+	Total
EBV+	3 (17,65%)	14 (82,35%)	17
EBV-	197 (78,17%)	55 (21,84%)	252
Total	200 (74,35%)	69 (25,65%)	269

$p<0,0001$

Todos os casos de AdG-EBV apresentaram positividade para células T CD4 e CD8, enquanto que os casos de AdG-não-EBV foram observados positividade para CD4 em 73,02% e para CD8 em 53,47%. Essa diferença de expressão entre os dois grupos foi estatisticamente significativa tanto pra expressão de CD4 quanto para a expressão de CD8, com  $p=0,0084$  e  $p<0,0001$  respectivamente (Tabelas 10 e 11).

**Tabela 11** - Distribuição dos casos EBV+/EBV- em relação à expressão de CD4+.

	CD4-	CD4+	Total
EBV+	0	17 (100%)	17
EBV-	68 (26,98%)	184 (73,02%)	252
Total	68 (25,28%)	201 (74,72%)	269

p=0,0084

**Tabela 12** - Distribuição dos casos EBV+/EBV-em relação à expressão de CD8+.

	CD8-	CD8+	Total
EBV+	0	17 (100%)	17
EBV-	117 (46,43%)	135 (53,47%)	252
Total	117 (43,5%)	152 (66,5%)	269

p&lt;0,0001

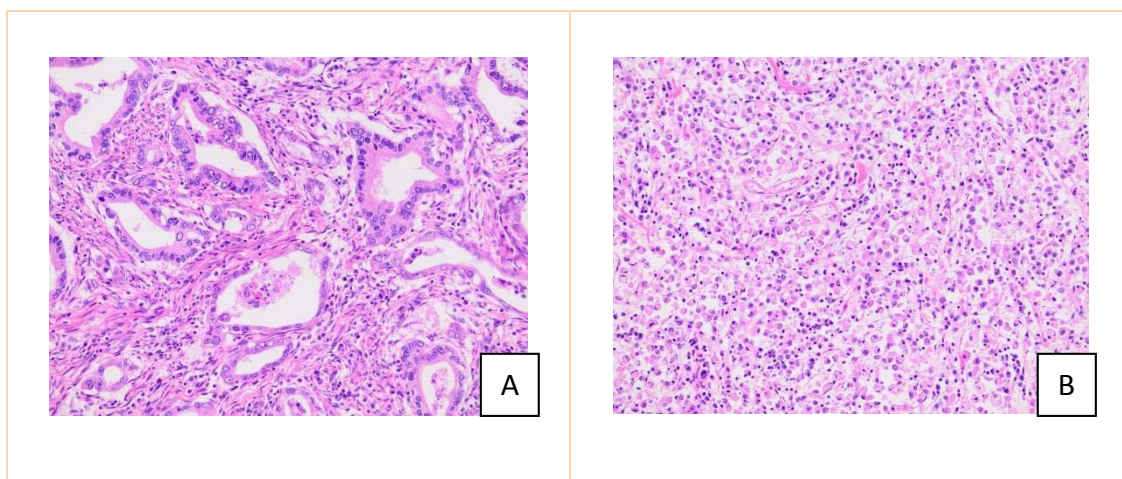
Foi observada maior expressão de p16 nos adenocarcinomas EBV-negativos quando comparados aos adenocarcinomas EBV-positivos (p=0,0146). (Tabela 12)

**Tabela 13** - Distribuição dos casos EBV+/EBV- em relação à expressão de p16

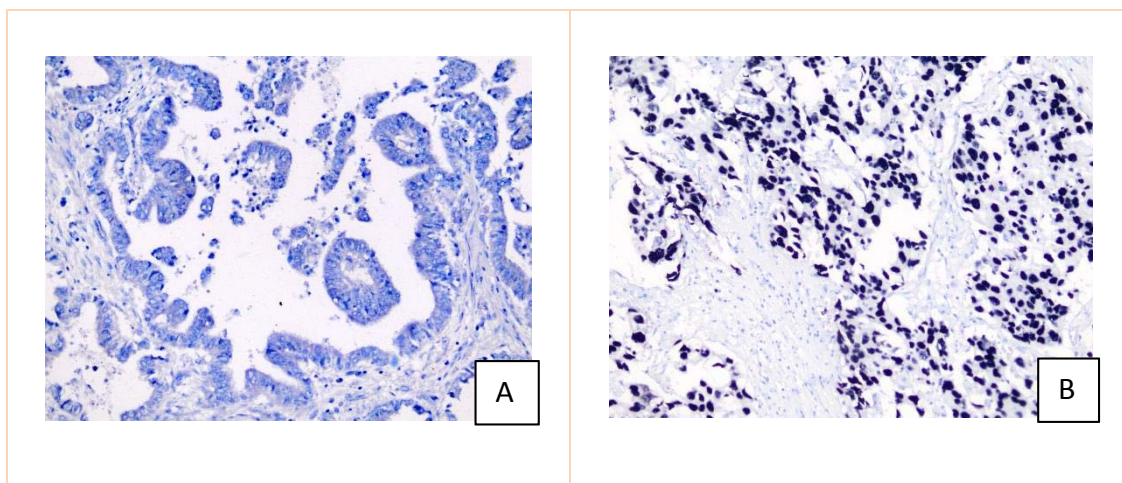
	p16+	p16-	Total
EBV+	6 (35,29%)	11 (64,71%)	17
EBV-	171 (67,86%)	81 (32,14%)	252
Total	177 (71,38%)	92 (28,62%)	269

p=0,0146

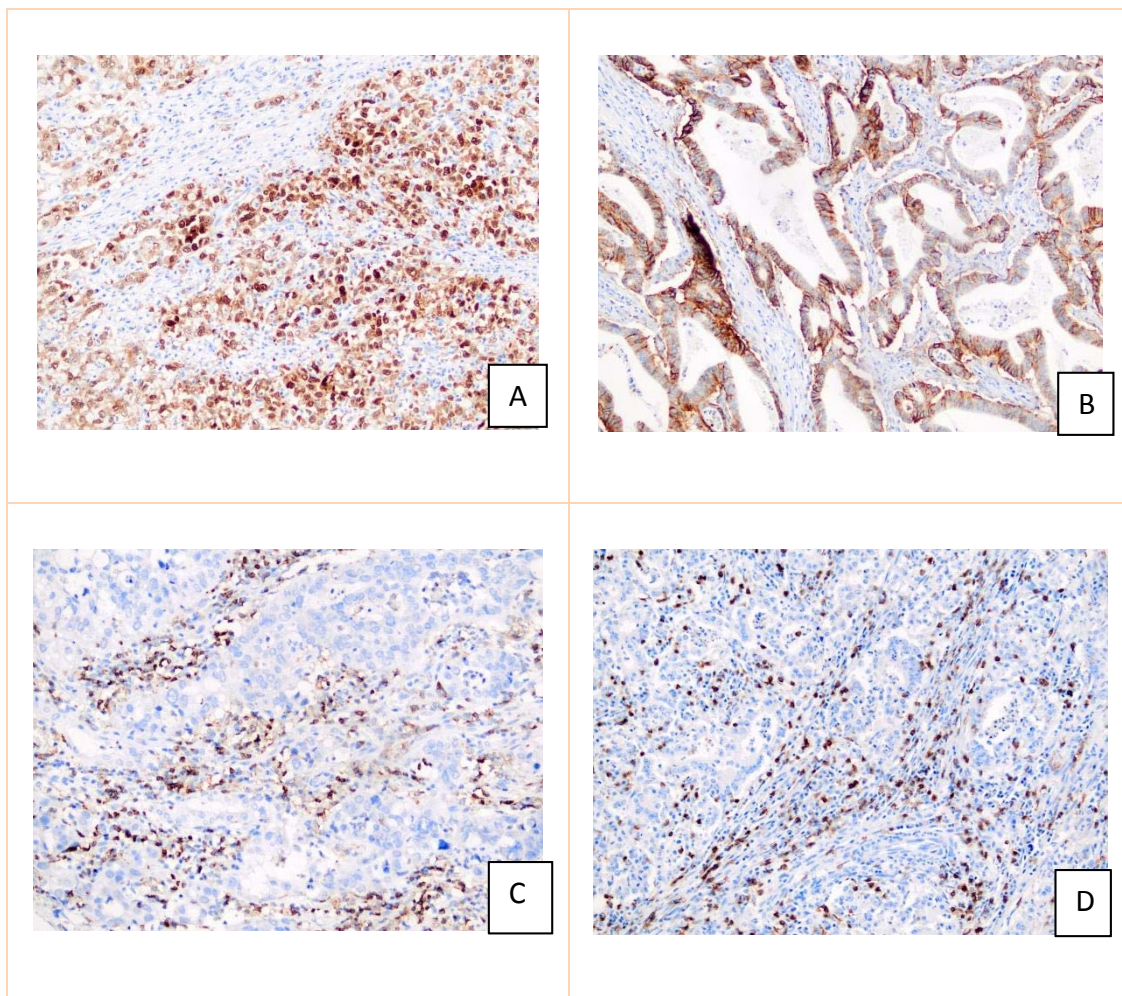
As figuras abaixo representam os achados histológicos e a imunopressão evidenciada nos AdG em alguns casos estudados (Figuras 5, 6 e 7).



**Figura 5** - Padrões histológicos de AdG em secções coradas por H&E (H&E X 200). **A:** Adenocarcinoma do tipo intestinal; **B:** Adenocarcinoma do tipo difuso



**Figura 6** - Padrões histológicos de AdG negativo e positivo. **A:** AdG EBV-negativo (Hibridização "in situ" X 200); **B:** AdG EBV-positivo (Hibridização "in situ" X 200).



**Figura 7** - Expressão de marcadores de imunohistoquímica. **A e B** - Expressão de marcadores p16 e PD-L1 em AdG, respectivamente (imunohistoquímica X 200); **C e D**: imunomarcção para linfócitos T e B em AcG (imunohistoquímica X 200).

## 5 DISCUSSÃO

O AdG é frequentemente diagnosticado em fases avançadas o que torna difícil seu tratamento, sendo, portanto uma das neoplasias com baixas taxas de sobrevivência e com alta taxa de mortalidade.

As classificações histopatológicas não conseguem prever o comportamento biológico e alguns estudos utilizando avaliação molecular buscam uma classificação que possa traduzir o comportamento biológico, bem como, a avaliação de alvos moleculares que possam ter aplicação terapêutica.

Esse novo enfoque dos carcinomas gástricos baseado em alterações moleculares foi publicado em 2014 pelo grupo *Cancer Genome Atlas Research Network-TCGA* (2014). Foram descritos quatro tipos moleculares: associados à infecção pelo vírus de EBV, tumores com instabilidade de microssatélites, tumores com genoma estável e tumores com instabilidade cromossômica.

Conforme conhecido há décadas e agora confirmado pelo estudo recente do TCGA, uma pequena parcela (cerca de 10%) dos casos de AdG está associada ao vírus de EBV. Os AdG-EBV afetam preferencialmente homens e usualmente estão localizados no estômago proximal e ocorrem numa faixa etária um pouco mais baixa.

Como ficou demonstrado neste estudo com casos da Liga Contra o Câncer do Rio Grande do Norte, de um estado da região Nordeste do Brasil,

num total de casos de 269 casos de AdG foram encontrados 17 casos associados com EBV (6,32%), com localização preferencial no corpo, corroborando com o que está descrito na literatura. Porém, a maioria dos casos de AdG-EBV avaliados acometeu pacientes acima de 50 anos e encontrava-se nos estádios T3 e T4 e com linfonodos positivos, diferente do que foi observado em outros trabalhos, refletindo um provável diagnóstico tardio da enfermidade nessa região do Brasil. Isso se deve à falta de políticas públicas para diagnóstico precoce dessa neoplasia e à dificuldade de acesso da população à exames endoscópicos, uma vez que trata-se de um serviço que atende preferencialmente pacientes de menor poder aquisitivo.

Na avaliação pela imunohistoquímica, a população de células neoplásicas destes casos estudados se misturou a um infiltrado inflamatório de células T, tanto de células CD4+ como de células CD8+ e expressando mais comumente PD-L1 que nos AdG-EBV negativos.

Recentemente, a imunoterapia tem sido aplicada em pacientes com AdG avançado com resultados promissores. A indicação do seu uso se faz com a avaliação por imunohistoquímica da expressão de PD-L1 nas células tumorais e em células da resposta imune associadas à neoplasia. São avaliadas todas as células que expressam o anticorpo anti-PD-L1 e se usa como denominador o número total de células tumorais na área avaliada.

Nos adenocarcinomas EBV-positivos (AdG-EBV), a positividade para PD-L1 foi observada em quase toda sua totalidade (82,35%,  $p < 0,0001$ ) e em todos os casos o infiltrado de células T CD4 e CD8 foi positivo (17/17). Notadamente, a expressão de PD-L1 foi mais detectada nos AdG EBV

positivos, sendo vista em apenas 21,84% dos casos AdG EBV negativos, concluindo-se, desta forma, que o AdG-EBV são candidatos a uma boa resposta à imunoterapia. Além disso, o infiltrado linfóide encontrado de forma exuberante no estroma tumoral de AdG pode ser um indicativo da evidência de associação com o EBV e, portanto, estará norteando estes casos para a investigação da presença viral através de hibridização “in situ” e se torna também um forte indicador da expressão do PD-L1.

A expressão de p16 em AdG-EBV tem tido resultados contraditórios com alguns trabalhos mostrando expressão de até 81,5% (OJIMA et al. 2006), enquanto outros estudos não conseguiram confirmar esses achados (LEE et al, 2004). O estudo do TCGA revelou a hipermetilação do gene CDKN2A em todos os AdG-EBV. Esse evento provoca o silenciamento da expressão desse gene sendo esperado, portanto, uma menor expressão do p16. Nosso estudo revelou uma expressão de 35,29% nos AdG-EBV e de 67,86% nos AdG-não-EBV, possivelmente corroborando com a possível hipermetilação e silenciamento gênico. Fica, portanto, demonstrado que este não é um bom marcador para o diagnóstico de AdG-EBV.

## 6 CONCLUSÕES

1. A frequência de AdG relacionados ao EBV na população tratada na Liga Contra o Câncer do Rio Grande do Norte foi mais baixa do que a demonstrada em outros trabalhos no Brasil.
2. Quando comparados com os AdG não relacionados ao EBV, os AdG-EBV+ mostraram que:
  - a. Não houve diferença em relação à idade;
  - b. A grande maioria (16/17) estavam em estágio T avançados;
  - c. Não houve diferenças em relação ao estágio N;
  - d. Mais frequentemente expressam PD-L1.
  - e. Mais frequentemente apresentam infiltrado inflamatório de células T, tanto de células CD4+ como de células CD8+;
  - f. p16 é menos frequentemente positivo nos AdG EBV do que nos AdG-não-EBV e portanto não pode ser usado como biomarcador preditivo da infecção pelo EBV.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Accetta AC, Manso JE, Mello EL, Paiva RK, Castro L dos S, Accetta P. Type IV Borrmann gastric adenocarcinoma: analysis of curative resection results. **Rev Col Bras Cir** 2011; 38:237-44.

Ahn HS, Shin YS, Park PJ, et al. Serum biomarker panels for the diagnosis of gastric adenocarcinoma. **Br J Cancer** 2012; 106:733-9.

Ajani JA, Blum MA, Estrella JS, Das P, Fournier KF. Gastric cancer: apples will always be apples. **J Clin Oncol** 2012; 30:1017-8.

Allison JP, Honjo T. **Discovery of cancer therapy by inhibition of negative immune regulation**. Available from: <URL:<https://bit.ly/2lvsmxQ>> [2018 mai 15]

Almeida PR, Ferreira VA, Santos CC, et al. E-cadherin immunoexpression patterns in the characterisation of gastric carcinoma histotypes. **J Clin Pathol** 2010; 63:635-9.

Ajani JA, In H, Sano T, et al. Stomach. In: Amin MB, Gress DM, Vega LRM, et al. editors. **AJCC cancer staging manual**. 8<sup>th</sup> ed. New York: Springer; 2017. p.203-20.

Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **J Bras Patol Med Lab** 2007; 43:55-60.

Asombang AW, Kelly P. Gastric cancer in Africa: what do we know about incidence and risk factors? **Trans R Soc Trop Med Hyg** 2012; 106:69-74.

Aoyagi K, Kouhiji K, Miyagi M, et al. Relevance of surgery in stage IV gastric carcinoma. **J Cancer Ther** 2013; 4:6-15.

Bang YJ, Kim YW, Yang HK, et al. Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): a phase 3 open-label, randomised controlled trial. **Lancet** 2012; 379:315-21.

Begnami MD, Montagnini AL, Vettore AL, et al. Differential expression of apoptosis related proteins and nitric oxide synthases in Epstein Barr associated gastric carcinomas. **World J Gastroenterol** 2006; 12:4959-65.

Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, et al. Recent patterns in gastric cancer: a global overview. **Int J Cancer** 2009; 125:666-73.

Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. **Immunity** 1995; 3:87-98.

Bosetti C, Malvezzi M, Chatenoud L, Negri E, Levi F, La Vecchia C. Trends in cancer mortality in the Americas 1970-2000. **Ann Oncol** 2006; 16:489-511.

Bouchardy C, Mirra AP, Khat M, Parkin DM, de Souza JM, Gotlieb SL. Ethnicity and cancer risk in São Paulo, Brazil. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1991; 1:21-7.

Bouchardy C, Khat M, Mirra AP, Parkin DM. Cancer risks among European migrants in São Paulo, Brazil. **Eur J Cancer** 1993; 29A:1418-23.

Boussiotis VA. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. **N Engl J Med** 2016; 375:1767-78.

Bivona TG, Perez De Castro I, Ahearn IM, et al. Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. **Nature** 2003; 424:694-8.

Bravo-Neto GP, dos Santos EG, Loja CA, et al. Minor gastric resections with modified lymphadenectomy in early gastric cancer with negative sentinel node. **Rev Col Bras Cir** 2012; 39:183-8.

Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **Int J Cancer** 2013; 132:1133-45.

Bu Z, Zheng Z, Li Z, et al. Clinicopathological and prognostic differences between mucinous gastric carcinoma and signet-ring cell carcinoma. **Chin J Cancer Res** 2013; 25:32-8.

Buergy D, Lohr F, Baack T, et al. Radiotherapy for tumors of the stomach and gastroesophageal junction-a review of its role in multimodal therapy. **Radiother Oncol** 2012; 7:192.

Bustamante-Teixeira MT, Faerstein E, Mariotto A, de Britto AV, Moreira Filho DC, Latorre MR. Survival in gastric cancer patients in Campinas, São Paulo, Brazil. **Cad Saude Publica** 2006; 22:1611-18.

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

Cappetta A, Lonardi S, Pastorelli D, Bergamo F, Lombardi G, Zagonel V. Advanced gastric cancer (GC) and cancer of the gastro-oesophageal junction (GEJ): focus on targeted therapies. **Crit Rev Oncol Hematol** 2012; 81:38-48.

Carneiro F. Classification of gastric carcinomas. **Curr Diagn Pathol** 1997; 4:51-9.

Casaretto L, Sousa PL, Mari JJ. Chemotherapy versus support cancer treatment in advanced gastric cancer: a meta-analysis. **Braz J Med Biol Res** 2006; 39:431-40.

Castagnola M, Picciotti PM, Messina I, et al. Potential applications of human saliva as diagnostic fluid. **Acta Otorrhinolaryngol Ital** 2011; 31:347-57.

Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. **Cell** 1992; 71: 649-62.

Chang ET, Gomez SL, Fish K, et al. Gastric cancer incidence among Hispanics in California: patterns by time, nativity, and neighborhood characteristics. **Cancer epidemiol Biomarkers Prev** 2012; 21:709-19.

Chang MS, Kim WH, Kim CW, Kim YI. Epstein-Barr virus in gastric carcinomas with lymphoid stroma. **Histopathology** 2000; 37:309-12.

Chapel F, Fabiani B, Davi F, et al. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma in Western patients: comparison of pathological parameters and p53 expression in EBV-positive and negative tumours. **Histopathology** 2000; 36:252-60.

Chatenoud L, Bertuccio P, Bosetti C, et al. Trends in cancer mortality in Brazil 1980-2004. **Eur J Cancer Prev** 2010; 19:79-86.

Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, et al. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. **J Immunol** 2004; 173:945-54.

Chen JN, He D, Tang F, Shao CK. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: a newly defined entity. **J Clin Gastroenterol** 2012; 46:262-271.

Chetty R. Gastrointestinal cancers accompanied by a dense lymphoid component: an overview with special reference to gastric and colonic medullary and lymphoepithelioma-like carcinomas. **J Clin Pathol** 2012; 65:1062-5.

Chiaravalli AM, Klersy C, Tava F, et al. Lower- and higher-grade subtypes of diffuse gastric cancer. **Hum Pathol** 2009; 40:1591-9.

Chiaravalli AM, Klersy C, Vanoli A, Ferretti A, Capella C, Solcia E. Histotype-based prognostic classification of gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2012; 18:896-904.

Chiba T, Marusawa H, Ushijima T. Inflammation-associated cancer development in digestive organs: mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. **Gastroenterology** 2012; 143:550-63.

Cho YH, Kim SY, Hong Lee M, et al. Comparative analysis of the efficacy and safety of chemotherapy with oxaliplatin plus fluorouracil/leucovorin between elderly patients over 65 years and younger patients with advanced gastric cancer. **Gastric Cancer** 2012; 15:389-95.

Chou JP, Effros RB. T cell replicative senescence in human aging. **Curr Pharm Des** 2013; 19:1680-98.

Correa P, Piazuelo MB, Camargo MC. The future of gastric cancer prevention. **Gastric Cancer** 2004; 7:9-16.

Costa WL Jr, Coimbra FJ, Ribeiro HS, et al. Safety and preliminary results of perioperative chemotherapy and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) for high-risk gastric cancer patients. **World J Surg Oncol** 2012; 10:195.

Coupland VH, Lagergren J, Konfortion J, Ethnicity in relation to incidence of oesophageal and gastric cancer in England. **Br J Cancer** 2012; 107:1908-14.

Crespo J, Sun H, Welling TH, et al. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. **Curr Opin Immunol** 2013; 25:214-21.

Curtsinger JM, Johnson CM, Mescher MF. CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. **J Immunol** 2003a; 171:5165-71.

Curtsinger JM, Lins DC, Mescher MF. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. **J Exp Med** 2003b; 197:1141-51.

Dai GH, Shi Y, Chen L, Lv YL, Zhong M. Trastuzumab combined with docetaxel-based regimens in previously treated metastatic gastric cancer patients with HER2 over-expression. **Hepatogastroenterology** 2012; 59:2439-43.

de Aquino PF, Carvalho PC, da Gama Fischer JS, et al. Epstein-Barr virus DNA associated with gastric adenocarcinoma and adjacent non-cancerous mucosa in patients from Manaus, Brazil. **Genet Mol Res** 2012; 11:4442-6.

de Souza RK, Gotlieb SL. Mortality among Japanese migrants living in the State of Parana, Brazil. **Rev Saúde Publica** 1999; 33:262-72.

De Vita F, Giuliani F, Silvestris N, Catalano G, Ciardiello F, Orditura M. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in gastric cancer: a new therapeutic target. **Cancer Treat Rev** 2010; 36:S11-5.

Dhingra S, Feng W, Brown RE, et al. Clinicopathologic significance of putative stem cell markers, CD44 and nestin, in gastric adenocarcinoma. **Int J Clin Exp Pathol** 2011; 4:733-41.

Dinis-Ribeiro M, Areia M, de Vries AC, et al. Management of precancerous conditions and lesions in the stomach (MAPS): guideline from the European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE), European Helicobacter Study Group (EHSg), European Society of Pathology(ESP), and the Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva (SPED). **Endoscopy** 2012; 44:74-94.

Dikken JL, van de Velde CJ, Coit DG, Shah MA, Verheij M, Cats A. Treatment of resectable gastric cancer. **Therap Adv Gastroenterol** 2012; 5:49-69.

Dikshit R, Gupta PC, Ramasundarahettige C, et al. Cancer mortality in India: a nationally representative survey. **Lancet** 2012; 379:1807-16.

Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. **Nat Med** 2002; 8:793-800.

Dong M, Wang HY, Zhao XX, et al. Expression and prognostic roles of PIK3CA, JAK2, PD-L1, and PD-L2 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. **Hum Pathol** 2016; 53:25-34.

Fahey MT, Hamada GS, Nishimoto IN, et al. Ethnic differences in serum pepsinogen levels among Japanese and non-Japanese Brazilian gastric cancer patients and controls. **Cancer Detect Prev** 2000; 24:564-71.

Fang D, Liu YC. Proteolysis-independent regulation of PI3K by Cbl-b-mediated ubiquitination in T cells. **Nat Immunol** 2001; 2:870-5.

Ferrasi AC, Pinheiro NA, Rabenhorst SH, et al. Helicobacter pylori and EBV in gastric carcinomas: Methylation status and microsatellite instability. **World J Gastroenterol** 2010; 16:312-9.

Ferte C, Romano O, Mariette C, et al. FOLFIRI chemotherapy in patients with advanced non resectable esophageal or junctional adenocarcinoma: a pilot study. **J Chemother** 2011; 23:358-61.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **J Exp Med** 2000; 192:1027-34.

Fuchs CS, Doi T, Jang RW, 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; 4:e18001.

Fuchs CS, Mayer RJ. Gastric carcinoma. **N Engl J Med** 1995; 333:32-41.

Fujimoto S, Takahashi M, Ohkubo H, et al. Clinicopathologic characteristics and survival of elderly patients with gastric cancer. **Anticancer Res** 1994; 14:1405-8.

Fujioka N, Fahey MT, Hamada GS, et al. Serological immunoglobulin G antibody titers to *Helicobacter pylori* in Japanese Brazilian and Non-Japanese Brazilian gastric cancer patients and controls in São Paulo. **Jpn J Cancer Res** 2001; 92:829-35.

Gato-Cañas M, Arasanz H, Blanco-Luquin I, et al. Novel immunotherapies for the treatment of melanoma. **Immunotherapy** 2016; 8:613-32.

Gigek CO, Leal MF, Lisboa LC, et al. Insulin-like growth factor binding protein-3 gene methylation and protein expression in gastric adenocarcinoma. **Growrh Horm IGF Res** 2010; 20:234-8.

Gomes TS, Oshima CT, Segreto HR, et al. The extrinsic apoptotic signaling pathway in gastric adenocarcinomas assessed by tissue microarray. **Pathol Res Pract** 2011; 207:613-7.

Gómez-Martin C, Garralda E, Echarri MJ, et al. HER2/neu testing for anti-HER2-based therapies in patients with unresectable and/or metastatic gastric cancer. **J Clin Pathol** 2012; 65:751-7.

Gonçalves AR, Carneiro AJ, Martins I, et al. Prognostic significance of p53 protein expression in early gastric cancer. **Pathol Oncol Res** 2011; 17:249-55.

Goseki N, Takizawa T, Koike M. Differences in the mode of the extension of gastric cancer classified by histological type: a new histological classification of gastric carcinoma. **Gut** 1992; 33:606-12.

Goslin B, Sevak S, Siripong A, et al. Outcomes of cytoreduction with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: our experience at a midwest community hospital. **Am J Surg** 2012; 203:383-6.

Guimarães RM, Muzi CD. Trend of mortality rates for gastric cancer in Brazil and regions in the period of 30 years (1980-2009). **Arq Gastroenterol** 2012; 49:184-8.



Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. **Annu Rev Immunol** 2005; 23:515-48.

Haas M, Dimmler A, Hohenberger W, Grabenbauer GG, Niedobitek G, Distel LV. Stromal regulatory T-cells are associated with a favourable prognosis in gastric cancer of the cardia. **BMC Gastroenterol** 2009; 9:65.

Haile RW, John EM, Levine AJ, et al. A review of cancer in U.S. Hispanic populations. **Cancer Prev Res** 2012; 5:150-63.

Hamada GS, Kowalski LP, Nishimoto IN, et al. Risk factors for stomach cancer in Brazil (II): a case-control study among Japanese Brazilians in São Paulo. **Jpn J Clin Oncol** 2002; 32:284-90.

Harder J, Ihorst G, Heinemann V, et al. Multicentre phase II trial of trastuzumab and capecitabine in patients with HER2 overexpressing metastatic pancreatic cancer. **Br J Cancer** 2012; 106:1033-8.

Herrera-Goepfert R, Akiba S, Koriyama C, et al. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: evidence of age-dependence among a Mexican population. **World J Gastroenterol** 2005; 11:6096-13.

Huang KH, Chen JH, Wu CW, et al. Factors affecting recurrence in node-negative advanced gastric cancer. **J Gastroenterol Hepatol** 2009; 24:1522-6.

Huang H, Jeon MS, Liao L, et al. K33-linked polyubiquitination of T cell receptor-zeta regulates proteolysis-independent T cell signaling. **Immunity** 2010; 33:60-70.

Huh CW, Jung da H, Kim JH, et al. Signet ring cell mixed histology may show more aggressive behavior than other histologies in early gastric cancer. **J Surg Oncol** 2013; 107:124-9.

Iijima K, Abe Y, Koike T, et al. Gastric cancers emerging after H. pylori eradication arise exclusively from non-acid-secreting areas. **Tohoku J exp Med** 2012; 226:45-53.

Inal A, Kaplan MA, Kucukoner M, Isikdogan A. Docetaxel and Cisplatin Plus Fluorouracil compared with modified Docetaxel, Cisplatin, and 5-Fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a retrospective analysis of single institution. **Neoplasma** 2012; 59:233-6.

Ishii H, Gobé G, Kawakubo Y, Sato Y, Ebihara Y. Interrelationship between Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas and the expression of apoptosis-associated proteins. **Histopathology** 2001; 38:111-9.

Ishii HH, Gobe GC, Yoneyama J, Mukaide M, Ebihara Y. Role of p53, apoptosis, and cell proliferation in early stage Epstein-Barr virus positive and negative gastric carcinomas. **J Clin Pathol** 2004; 57:1306-11.

Iwasa S, Goto M, Yasui H, et al. Multicenter feasibility study of combination therapy with fluorouracil, leucovorin and paclitaxel (FLTAX) for peritoneal disseminated gastric cancer with massive ascites or inadequate oral intake. **Jpn J clin Oncol** 2012; 42:787-93.

Iwasaki M, Mameri CP, Hamada GS, Tsugane S. Cancer mortality among Japanese immigrants and their descendants in the state of São Paulo, Brazil 1999-2001. **Jpn J Clin Oncol** 2004; 34:673-80.

Jácome AA, Wohnrath DR, Scapulatempo Neto C, et al. Effect of adjuvantchemoradiotherapy on overall survival of gastric cancer patients submitted to D2 lymphadenectomy. **Gastric Cancer** 2013; 16:233-8.

Jeong O, Jung MR, Kim GY, Kim HS, Ryu SY, Park YK. Comparison of short-term surgical outcomes between laparoscopic and open total gastrectomy for gastric carcinoma: case-control study using propensity score matching method. **J Am Coll Surg** 2013; 216:184-91.

Jing JJ, Liu HY, Hao JK, et al. Gastric cancer incidence and mortality in Zhuanghe, China, between 2005 and 2010. **World J Gastroenterol** 2012; 18:1262-89.

Jo JC, Lee JL, Ryu MH, et al. Phase II and UGT1A1 genotype study of irinotecan dose escalation as salvage therapy for advanced gastric cancer. **Br J Cancer** 2012; 106:1591-7.

Kang JH, Lee SI, Lim do H, 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; 30:1513-8.

Kataoka Y, Okabe H, Yoshizawa A, et al. HER2 expression and its clinicopathological features in resectable gastric cancer. **Gastric Cancer** 2013; 16:84-93.

Karwacz K, Bricogne C, MacDonald D, et al. PD-L1 co-stimulation contributes to ligand-induced T cell receptor down-modulation on CD8+ T cells. **EMBO Mol Med** 2011; 3:581-92.

Kijima Y, Ishigami S, Hokita S, et al. The comparison of the prognosis between Epstein-Barr virus (EBV)-positive gastric carcinomas and EBV-negative ones. **Cancer Lett** 2003; 200:33-40.

Kim HS, Lee H, Jeung HC, et al. Advanced detection of recent changing trends in gastric cancer survival: up-to-date comparison by period analysis. **Jpn J Clin Oncol** 2011; 41:1344-50.

Kim JW, Im SA, Kim M, et al. The prognostic significance of HER2 positivity for advanced gastric cancer patients undergoing first-line modified FOLFOX-6 regimen. **Anticancer Res** 2012; 32:1547-53.

Kim MH, Zhang X, Jung M, et al. Immunohistochemistry biomarkers predict survival in stage ii/iii gastric cancer patients: from a prospective clinical trial. **Cancer Res Treat** 2019; 51:819-31.

Kofoed SC, Muhic A, Baeksgaard L, et al. Survival after adjuvant chemoradiotherapy or surgery alone in resectable adenocarcinoma at the gastro-esophageal junction. **Scand J Surg** 2012; 101:26-31.

Koh J, Ock CY, Kim JW, et al. Clinicopathologic implications of immune classification by PD-L1 expression and CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes in stage II and III gastric cancer patients. **Oncotarget** 2017; 8:26356-67.

Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, et al. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. **Clin Cancer Res** 2004; 10:5094-100.

Koriyama C, Akiba S, Itoh T, et al. Prognostic significance of Epstein-Barr virus involvement in gastric carcinoma in Japan. **Int J Mol Oncol** 2002; 10:635-9.

Koriyama C, Akiba S, Corvalan A, et al. Histology-specific gender, age and tumor-location distributions of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Japan. **Oncol Rep** 2004; 12:543-7.

Kume T, Oshima K, Shinohara T, et al. Low rate of apoptosis and overexpression of bcl-2 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. **Histopathology** 1999; 34:502-9.

Latorre Mdo R. Stomach cancer mortality in Brazil: from 1977 to 1989. **Cad Saude Pub** 1997; 13 Suppl 1:67-78.

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.

Lauwers GY, Carneiro F, Correia P, et al. Gastric carcinoma. In: Bowman FT, Carneiro F, Hruban RH, editors. **Classification of tumors of the digestive system**. 4<sup>th</sup> ed. Lyon: IARC Press; 2010. p.48-58. (WHO Classification of Tumours, Volume 3, IARC WHO Classification of Tumours, n° 3).

Lee HE, Chae SW, Lee YS, et al. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. **Br J Cancer** 2008; 99:1704-11.

Lee HS, Chang MS, Yang HK, Lee BL, Kim WH. Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma has a distinct protein expression profile in comparison with Epstein-Barr virus-negative carcinoma. **Clin Cancer Res** 2004; 10:1698-705.

Lima MA, Ferreira MV, Barros MA, et al. Relationship between EBV infection and expression of cellular proteins c-Myc, Bcl-2, and bax in gastric carcinomas. **Diagn Mol Pathol** 2008; 17:82-9.

Lopes LF, Bacchi MM, Elgui-de-Oliveira D, Zanati SG, Alvarenga M, Bacchi CE. Epstein-Barr virus infection and gastric carcinoma in São Paulo State, Brazil. **Braz J Med Biol Res** 2004; 37:1707-12.

Lourenço LG, Hamada GS. Gastric cancer in Brazil. **Gastric Cancer** 2001; 4:103-5.

Ma C, Patel K, Singhi AD, Ren B, Zhu B, Shaikh F, Sun W. Programmed Death-Ligand 1 Expression is common in gastric cancer associated with Epstein-Barr virus or microsatellite instability. **Am J Surg Pathol** 2016; 40:1496-506.

Matsuda A, Machii R. Trends in stomach cancer mortality rates in Japan, USA, UK, France and Korea based on the WHO mortality database. **Jpn J Clin Oncol** 2012; 42:154.

Medrado-Faria MA, Rodrigues de Almeida JW, Zanetta DM Gastric and colorectal cancer mortality in an urban and industrialized area of Brazil. **Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo** 2001; 56:47-52.

Meyer A, Chrisman J, Moreira JC, Koifman S. Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Env Res** 2003; 93:264-71.

Milne AN, Carvalho R, Morsink FM, et al. Early-onset gastric cancers have a different molecular expression profile than conventional gastric cancers. **Mod Pathol** 2006; 19:564-72.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro; INCA: 2013.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Atlas de mortalidade por câncer**. Rio de Janeiro: INCA; 2014. Disponível em: <URL:<https://www.inca.gov.br/app/mortalidade>> [2018 fev 12]

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro; INCA: 2018.

Ming S-C. Gastric carcinoma: a pathobiological classification. **Cancer** 1977; 39:2475-85.

Mohammad HA, Magdy FM, Mahmoud OM. FOLFOX (oxaliplatin and 5 fluorouracil/leucovorin) in patients with untreated metastatic gastric adenocarcinoma Phase II study. **Indian J Cancer** 2011; 48:460-5.

Murphy G, Pfeiffer R, Camargo MC, Rabkin CS. Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location. **Gastroenterology** 2009; 137:824-33.

Nagini S. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. **World J Gastroenterol Oncol** 2012; 4:156-69.

Naramura M, Jang IK, Kole H, et al. c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. **Nat Immunol** 2002; 3:1192-9.

Naseem M, Barzi A, Brezden-Masley C, et al. Outlooks on Epstein-Barr virus associated gastric cancer. **Cancer Treat Rev** 2018; 66:15-22.

[NCI] National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology and End Results Program. **Cancer stat facts: stomach cancer**. Available from: <URL:<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/stomach.html>> [2019 fev 15].

Neel BG, Gu H, Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. **Trends Biochem Sci** 2003; 28:284-93.

Nishimoto IN, Hanaoka T, Sugimura H, et al. Cytochrome P450 2E1 polymorphism in gastric cancer in Brazil: case-control studies of Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. **Cancer epidemiol Biomarkers Prev** 2000; 9:675-80.

Nurieva R, Thomas S, Nguyen T, et al. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. **EMBO J** 2006; 25:2623-33.

Ojima H, Saito K, Yamauchi H, et al. P16 protein abnormality in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. **Anticancer Res** 2006; 26:933-7.

Oki E, Okano S, Saeki H, Umemoto Y, et al. Protein expression of programmed death 1 ligand 1 and HER2 in gastric carcinoma. **Oncology** 2017; 93:387-94.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. **Int J Cancer** 1993; 54:594-606.

Parkin DM. International variation. **Oncogene** 2004; 23:6329-40.

Patsoukis N, Brown J, Petkova V, et al. Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. **Sci Signal** 2012a; 5:ra46.

Patsoukis N, Sari D, Boussiotis VA. PD-1 inhibits T cell proliferation by upregulating p27 and p15 and suppressing Cdc25A. **Cell Cycle** 2012b; 11:4305-9.

Patsoukis N, Li L, Sari D, et al. PD-1 increases PTEN phosphatase activity while decreasing PTEN protein stability by inhibiting casein kinase 2. **Mol Cell Biol** 2013; 33:3091-8.

Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. **Nat Commun** 2015; 6:6692.

Pereira L, Zamudio R, Soares-Souza G, et al. Socioeconomic and nutritional factors account for the association of gastric cancer with Amerindian ancestry in a Latin American admixed population. **Plos One** 2012; 7:e41200.

Pereira MA, Ramos MFKP, Faraj SF, et al. Clinicopathological and prognostic features of Epstein-Barr virus infection, microsatellite instability, and PD-L1 expression in gastric cancer. **J Surg Oncol** 2018; 117:829-39.

Rathmell JC, Vander Heiden MG, Harris MH, et al. In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. **Mol Cell** 2000; 6:683-92.

Ramos MFKP, Pereira MA, Dias AR, et al. Lymphoepithelioma-like gastric carcinoma: clinicopathological characteristics and infection status. **J Surg Res** 2017; 210:159-68.



Resende AL, Mattos IE, Koifman S. Gastric cancer mortality in the State of Pará, Brazil 1980-1997. **Arq Gastroenterol** 2006; 43:247-51.

Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. **Immunol Rev** 2009; 229:114-25.

Round JL, Humphries LA, Tomassian T, et al. Scaffold protein Dlg1 coordinates alternative p38 kinase activation, directing T cell receptor signals toward NFAT but not NF-kappaB transcription factors. **Nat Immunol** 2007; 8:154-61.

Saito R, Abe H, Kunita A, Yamashita H, Seto Y, Fukayama M. Overexpression and gene amplification of PD-L1 in cancer cells and PD-L1(+) immune cells in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: the prognostic implications. **Mod Pathol** 2017; 30:427-39.

Salvador JM, Mittelstadt PR, Guszczynski T, et al. Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. **Nat Immunol** 2005; 6:390-5.

Seo AN, Kang BW, Kwon OK, et al. Intratumoural PD-L1 expression is associated with worse survival of patients with Epstein-Barr virus-associated gastric cancer. **Br J Cancer** 2017; 117:1753-60.

Shen X, Zheng JY, Shi H, Zhang Z, Wang WZ. Survivin knockdown enhances gastric cancer cell sensitivity to radiation and chemotherapy in vitro and in nude mice. **Am J Med Sci** 2012; 344:52-8.

Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, et al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. **Nat Immunol** 2007; 8:239-45.

Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, et al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. **FEBS Lett** 2004; 574:37-41.

Shinozaki-Ushiku A, Kunita A, Fukayama M. Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer (review). **Int J Oncol** 2015; 46:1421-34.

Sieh M, Batzer A, Schlessinger J, et al. GRB2 and phospholipase C-gamma 1 associate with a 36-to 38-kilodalton phosphotyrosine protein after T-cell receptor stimulation. **Mol Cell Biol** 1994; 14:4435-42.

Silva EM. **Morfogênese dos adenocarcinomas gástricos e expressão de E-caderina, Beta-Catenina, Clatrina e Mucinas**. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

Silva EM, Achatz MIW, Martel-Planche G, et al. *TP53* mutation p.R337H in gastric cancer tissues of a 12-year-old male child – evidence for chimerism involving a common mutante founder haplotype: case report. **BMC Cancer** 2011; 111:449.

Stewart BW, Kleihues P. World Cancer Report. Lyon: IARC Press, 2003, Human cancer by organ site; p.194-7.

Tkachev V, Goodell S, Opiari AW, et al. Programmed death-1 controls T cell survival by regulating oxidative metabolism. **J Immunol** 2015; 194:5789-800.

Torres J, Pulido R. The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. **J Biol Chem** 2001; 276:993-8.

Tsugane S, de Souza JM, Costa ML Jr, et al. Cancer incidence rates among Japanese immigrants in the city of São Paulo, Brazil 1969-78. **Cancer Causes Control** 1990; 1:189-93.

Tybulewicz VL. Vav-family proteins in T-cell signalling. **Curr Opin Immunol** 2005; 17:267-74.

Umeyama K, Sowa M, Kamino K, Kato Y, Satake K. Gastric carcinoma in young adults in Japan. **Anticancer Res** 1982; 2:283-6.

Wang P, Zhang Q, Yang JF, Cheng ZN, Zhang K, Yu DH. [Epstein-Barr virus infection and p16(INK4a) overexpression in gastric adenocarcinoma]. **Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi** [abstract] 2008; 22:244-6.

Wei F, Zhong S, Ma Z, et al. Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2013; 110:E2480-9.

Wen T, Wang Z, Li Y, Li Z, et al. A four-factor immunoscore system that predicts clinical outcome for stage II/III gastric cancer. **Cancer Immunol Res** 2017; 5:524-34.

Werner M, Becker KF, Keller G, Höfler H. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. **J Cancer Res Clin Oncol** 2001; 127:207-16.

Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, et al. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. **J Exp Med** 2012; 209:1201-17.

Zazula M, Ferreira AM, Czopek JP, et al. CDH1 gene promoter hypermethylation in gastric cancer: relationship to Goseki grading, microsatellite instability status, and EBV invasion. **Diagn Mol Pathol** 2006; 15:24-9.

Zendejdel K, Marzban M, Nahvijou A, Jafari N. Six-fold difference in the stomach cancer mortality rate between Northern and Southern Iran. **Arch Iran Med** 2012; 15:741-6.

Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. **Nat Rev Immunol** 2008; 8:467-77.

Zuazo M, Gato-Cañas M, Llorente N, et al. Molecular mechanisms of programmed cell death-1 dependent T cell suppression: relevance for immunotherapy. **Ann Transl Med** 2017; 5:385.

## Anexo 1 - 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

São Paulo, 13 de fevereiro de 2019.

Ao  
Dr. Emmanuel Dias-Neto

Ref. Projeto de Pesquisa nº. 2134/15  
"Genômica de Adenocarcinomas Gástricos."

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de 12/02/2019, **tomaram conhecimento** do seguinte documento:

- Inclusão do aluno Carlos Cesar de Oliveira Ramos, orientando do Dr. Fernando Augusto Soares, carta datada de 29 de janeiro de 2019.

Atenciosamente,

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