

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E MOLECULARES DAS
NEOPLASIAS NEUROENDÓCRINAS GASTROINTESTINAIS DE
GRAU 3: EPIDEMIOLOGIA E FATORES PROGNÓSTICOS**

RODRIGO GOMES TABOADA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente para
obtenção do Título de Mestre em Ciências**

Orientadora: Dra. Rachel Simões Pimenta Riechelmann

São Paulo

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

T114c Taboada, Rodrigo Gomes

**Características clínicas e moleculares das neoplasias neuroendócrinas
gastrointestinais de grau 3: epidemiologia e fatores prognósticos** / Rodrigo Gomes

Taboada - São Paulo, 2021.

40p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Rachel Simões Pimenta Riechelmann

Descritores. 1. Carcinoma Neuroendócrino/Carcinoma, Neuroendocrine
2. Prognóstico/Prognosis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo exemplo de resiliência e suporte incondicional durante meu crescimento pessoal e profissional. À minha família e amigos pelo amor e paciência. À eterna turma 64, exemplo de companheirismo.

Agradeço à Dra. Rachel Riechermann, minha orientadora e mentora em minha trajetória profissional. Uma inspiração ao aperfeiçoamento contínuo.

Agradeço à Dra. Laura Lopez pelo essencial auxílio patológico, aos coautores Dr. Tiago Felismino, Dr. Victor Hugo, Dr. Milton Barros. Agradeço à Suely Francisco pelo apoio do início ao fim e aos valiosos comentários do Dr. Duílio Rocha e Dra. Marina de Brot. Aos professores e funcionários da Pós-Graduação e titulares do A.C.Camargo Cancer Center. Todos contribuíram para a minha formação e sou, de coração, grato a todos.

À Bela, pelo meu maior presente. Eu te amo!

RESUMO

Taboada RG. **Características clínicas e moleculares das neoplasias neuroendócrinas gastrointestinais de grau 3: epidemiologia e fatores prognósticos.** [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2021.

A classificação de tumores da Organização Mundial de Saúde (WHO) em 2019 subclassificou as neoplasias neuroendócrinas (NEN) gastroenteropancreáticas (GEP) de grau 3 (G3) em carcinomas neuroendócrinos (NEC) e em tumores neuroendócrinos (TNE G3), baseando-se em morfologia e proliferação celular. No entanto, são escassos os dados de perfil molecular para as NEN G3. Comparamos características clinicopatológicas e moleculares destes dois grupos. De modo retrospectivo, identificamos pacientes consecutivos com NEN GEP G3, revisamos seus tecidos tumorais armazenados em parafina, os reclassificando de acordo com a classificação WHO 2019 e os analisamos com um painel de sequenciamento genético de nova geração (NGS). Entre 2000 e 2019, 43 pacientes tiveram revisão patológica: 29 (67%) sendo NEC e 14 (33%) sendo TNE G3, com uma mudança no diagnóstico de 23%. A mediana de sobrevida global para os pacientes com TNE G3 e NEC foram 55,6 e 11,9 meses, respectivamente (hazard ratio [HR] 2,78; intervalo de confiança [IC] 95% 1,09 – 7,11; $p = 0.042$), confirmada por uma análise multivariável (HR 2,9 NEC vs. TNE G3; $p = 0.03$). NGS foi realizado em 32 casos: 21 NEC e 11 TNE G3. Mutações em *RB1* e em *PTEN* foram exclusivamente encontradas em NEC. A carga mutacional mediana foi de 5 (0 – 67) mutações por megabases em NEC e 4,5 (0 – 9) entre os TNE G3. Instabilidade de microssatélites foi encontrada em 3 (14,3%) casos de NEC. Em conclusão, a revisão patológica é essencial para estimar o prognóstico e plano terapêutico. NEN GEP G3 geralmente possuem baixa carga mutacional e poucas mutações acionáveis, mas 14% dos casos de NEC apresentaram instabilidade de microssatélites e poderiam se beneficiar dos bloqueadores de correceptores imunes.

Descritores: Carcinoma Neuroendócrino, Tumores Neuroendócrinos, Biologia Molecular

ABSTRACT

Taboada RG. **Clinicopathological and Molecular Profile of Grade 3 Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms.** [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2021.

The 2019 WHO subclassified grade 3 (G3) gastroenteropancreatic (GEP) neuroendocrine neoplasms (NEN) into neuroendocrine carcinoma (NEC) and tumours (G3 NET) based on morphology and proliferation. Yet, few data exist on molecular profiles for G3 NEN. We compared clinicopathological and molecular characteristics of these two groups. We retrospectively reviewed consecutive G3 GEP NEN patients and had their tumour tissues reviewed, reclassified as per the WHO 2019, and analysed by a next-generation sequencing (NGS) panel. Between 2000 and 2019, 43 patients had pathology revision: 29 (67%) were NEC and 14 (33%) were G3 NET, with a 23% change in diagnosis. Median overall survival for G3 NET and NEC patients were 55.6 and 11.9 months, respectively (HR 2.78 [95% CI 1.09 – 7.11], $p = 0.042$), which was confirmed by an adjusted analysis (HR 2.90 NEC vs. G3 NET; $p = 0.03$). NGS was performed in 32 cases: 21 NEC and 11 G3 NET. Mutations in *RB1*, and *PTEN* were exclusively encountered in NEC. Median tumour mutational burden was 5 (0 – 67) mutations per megabase in NEC and 4.5 (0 – 9) among G3 NET. Microsatellite instability was found in 3 (14.3%) NEC cases. In conclusion, pathology revision is essential to estimate prognosis and therapeutic plan. G3 GEP NEN generally harbour low TMB and fewer actionable mutations, but 14% of NEC cases were microsatellite unstable and could benefit from immune checkpoint inhibitors.

Keywords: Neuroendocrine Carcinoma; Neuroendocrine Tumors; Molecular Biology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1a	TNE pancreático G3 com cromogranina A positiva	13
Figura 1b	TNE pancreático G3 com Ki-67 de 60%.....	14
Figura 1c	TNE pancreático G3 em HE – aumento de 10x	14
Figura 1d	TNE pancreático G3 em HE – aumento de 40x	15
Figura 2	Fluxograma com descrição dos casos incluídos no estudo.....	19
Figura 3	Localização do tumor primário	20
Figura 4	Descrição do Ki-67 e da diferenciação por TNE G3 e NEC	22
Figura 5	Heat map descrevendo as alterações genômicas.....	23
Figura 6a	Diagrama Sankey de tratamentos sequenciais e pacientes com NEN G3	24
Figura 6b	Diagrama Sankey de tratamentos sequenciais e pacientes com NEC	25
Figura 6c	Diagrama Sankey de tratamentos sequenciais e pacientes com NET G3.....	25
Figura 7	Não-pancreático: TNE G3 vs. NEC – estimativas para sobrevida global	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das neoplasias neuroendócrinas do trato gastrointestinal	3
Tabela 2	Características histológicas dos NEN G3	15
Tabela 3	Características clinicopatológicas e associação com TNE e NEC.....	21
Tabela 4	Perfil molecular	23
Tabela 5	Resultados de análises univariadas e multivariáveis por regressão de Cox para sobrevida global.....	26
Tabela 6	Terapia com bloqueadores dos correceptores imunes em NEN G3.....	29
Tabela 7	Tratamento do TNE G3.....	30

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIPE	Centro Internacional de Pesquisa
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
ENETS	<i>European Neuroendocrine Tumour Society</i>
IMC	Índice de massa corpórea
G1	Grau 1
G2	Grau 2
G3	Grau 3
HR	<i>Hazard ratio</i>
MiNEN	<i>Mixed neuroendocrine non-neuroendocrine neoplasms</i>
NA	Não alcançado
NEC	Carcinoma neuroendócrinos (do inglês, <i>neuroendocrine carcinoma</i>)
NEN	Neoplasias neuroendócrinas
NGS	Sequenciamento de próxima geração (do inglês, <i>Next Generation Sequencing</i>)
<i>p</i>	<i>p</i> -valor
PD-L1	<i>Programmed cell death-ligand 1</i>
PET-CT 18F-FDG	<i>Fluorodeoxyglucose positron emission tomography</i>
PET-CT 68Ga	<i>Gallium-68 positron emission tomography</i>
TNE	Tumor neuroendócrino
Vs	Versus
WHO	Organização Mundial de Saúde (do inglês, <i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia	1
1.2	Diagnóstico	2
1.3	Classificações	2
1.3.1	Perspectiva histórica das classificações patológicas	2
1.3.2	Heterogeneidade das NEN gastroenteropancreáticas G3	3
1.4	Prognóstico	4
1.5	Tratamento	5
1.6	Medicina Personalizada	5
1.6.1	Oncologia personalizada nas NEN	6
1.6.2	Sequenciamento massivo paralelo	7
2	JUSTIFICATIVA	8
3	OBJETIVOS	9
3.1	Objetivo Geral	9
3.2	Objetivos Específicos	9
4	MÉTODOS	10
4.1	Tipo do Estudo	10
4.2	Desfechos.....	10
4.2.1	Desfechos primários	10
4.2.2	Desfechos secundários	10
4.3	População do Estudo	10
4.3.1	Elegibilidade – Critérios de inclusão	10
4.3.2	Elegibilidade – Critérios de exclusão	11
4.4	Desenho do Estudo	11
4.4.1	Coleta de variáveis.....	11
4.4.2	Avaliação patológica	12

4.4.3	Avaliação molecular.....	15
4.5	Considerações Estatísticas.....	16
4.6	Aspectos Éticos	17
4.7	Custos.....	18
5	RESULTADOS	19
5.1	Características dos Pacientes.....	19
5.2	Características Histopatológicas e Moleculares	20
5.3	Manejo Clínico e Desfechos de Sobrevida.....	24
6	DISCUSSÃO.....	27
7	CONCLUSÃO	32
8	REFERÊNCIAS.....	33

ANEXOS

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

Anexo 2 Comprovante da submissão do artigo científico

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias neuroendócrinas (NEN) consistem em um heterogêneo grupo de neoplasias originadas de células neuroendócrinas difusamente presentes pelo corpo, exibindo uma significativa variedade de apresentações e desfechos¹. Desde a descrição e estabelecimento do termo carcinoide (*"Karzinoide Tumoren"*) por Oberndorfer em 1907, esses tumores foram chamados de neuroectodérmicos, tumores da crista neural, apudomas, tumores neuroendócrinos e o atual, NEN². A evolução na nomenclatura reflete o conhecimento progressivo sobre esse grupo de doenças.

1.1 EPIDEMIOLOGIA

As NEN são raras. Considerando todas as neoplasias malignas do trato gastrointestinal, que é o sistema mais acometido, elas representam cerca de 1,5%. Destas, apenas 5% pertencem ao grupo de alto grau^{3,4}.

Em um estudo populacional norte-americano com 64.971 pacientes portadores de NEN, a incidência ajustada pela idade aumentou 6,4 vezes entre 1973 (1,09 em 100.000) e 2012 (6,98 em 100.000), o que demonstra que embora sejam neoplasias raras, sua incidência tem crescido nos últimos anos, particularmente as de origem gastrointestinal^{5,6}. Em parte, devido ao aumento no acesso e na melhoria das técnicas de imagem, e em seu maior conhecimento pelas comunidades clínicas e patológicas. No Brasil, não é possível realizar esta avaliação visto que inexistem dados epidemiológicos nacionais com relação às NEN.

O sítio primário de NEN mais comum é o pulmonar, que inclui os tumores de pequenas células pulmonares que compartilham com os carcinomas neuroendócrinos extrapulmonares características histopatológicas e de tratamento, embora os desfechos possam variar⁵⁻⁷. No entanto, o sistema mais acometido por NEN é o gastrointestinal⁵.

1.2 DIAGNÓSTICO

As NEN consistem em um raro, amplo e heterogêneo grupo de neoplasias, originadas de células produtoras de peptídeos ativos, hormônios, e que compartilham um fenótipo neural e endócrino. São descritas por todo o corpo, tanto no sistema neuroendócrino difuso (ex., no trato gastrointestinal, pulmões), estruturas nervosas (ex., paraganglioma, neuroblastoma) ou em órgãos endócrinos (ex., adenohipófise, medula adrenal).

As NEN podem variar morfológicamente, embora comumente apresentem características endócrinas, como vesículas e grânulos, e expressam marcadores imunohistoquímicos neuroendócrinos, principalmente cromogranina A e sinaptofisina (Figura 1a). A avaliação patológica acurada, além de essencial para o diagnóstico, é o primeiro passo para individualizar o manejo dos pacientes, com papel primordial para prognosticar e prever o benefício de terapias.

1.3 CLASSIFICAÇÕES

A complexidade deste grupo de neoplasias reflete-se na variedade de classificações possíveis, considerando, entre outros, o local de origem, estadiamento, comportamento clínico, a presença de síndromes funcionantes, o grau de proliferação e a diferenciação histológica.

1.3.1 Perspectiva histórica das classificações patológicas

Em 1980, a Organização Mundial de Saúde (WHO) aplicou o termo carcinoide para descrever todos os tumores neuroendócrinos (TNE), exceto os de origem pulmonar⁸. Essa classificação além de não se correlacionar com o comportamento clínico, gerou uma confusão de nomenclatura pelo uso irrestrito do termo carcinoide entre os patologistas e a síndrome carcinoide, definida clinicamente.

Em 1983, foi criado o anticorpo monoclonal murino MIB-1, anti-Ki-67⁹. Ki-67 é uma proteína nuclear expressa em células em proliferação (fases S e M do ciclo celular). Em 1996, foram descritos os primeiros relatos do papel prognóstico do índice de Ki-67 em TNE usando o anticorpo MIB-1^{10, 11}. Em 2000, a primeira classificação da WHO para as NEN favoreceu o uso do termo TNE, em detrimento de tumor carcinoide¹². Em 2006, a classificação da

sociedade europeia de TNE (ENETS) propôs um sistema de graduação de proliferação com base no Ki-67¹³. Em 2010, a WHO classificou as NEN de acordo com o prognóstico considerando a histopatologia e o índice proliferativo Ki-67¹⁴. A classificação WHO foi revisada em 2017, e em 2019, com o reconhecimento de um novo grupo de NEN bem diferenciadas.

A classificação WHO 2019 definiu as seguintes categorias prognósticas: TNE grau 1 (G1) (tumores bem diferenciados, com Ki-67 < 3% e/ou contagem mitótica <2/2 mm²); TNE grau 2 (G2) (tumores bem diferenciados, com Ki-67 entre 3%-20% e/ou contagem mitótica 2-20/2 mm²); TNE grau 3 (G3) (bem diferenciado, com Ki-67 > 20% e/ou contagem mitótica > 20/2 mm²); carcinoma neuroendócrino (NEC) (pouco diferenciado, com Ki-67 > 20% e/ou contagem mitótica > 20/2 mm²) (Tabela 1). O termo neoplasia inclui tanto os tumores (bem diferenciados) quanto os carcinomas neuroendócrinos (pouco diferenciados).

Tabela 1 - Classificação das neoplasias neuroendócrinas do trato gastrointestinal¹⁵.

Terminologia	Diferenciação	Grau	Contagem de mitoses/2mm ²	Índice de Ki-67
TNE G1	Bem diferenciado	Baixo	< 2	< 3%
TNE G2		Intermediário	2-20	3-20%
TNE G3		Alto	> 20	> 20%
NEC, pequenas células	Pouco diferenciado	Alto	> 20	> 20%
NEC, grandes células	diferenciado		> 20	> 20%
MiNEN	Bem ou pouco diferenciado	Variável	Variável	Variável

Nota 1: A contagem de mitoses é expressa como o número de mitoses/2 mm² (equivalente à 10 campos de grande aumento com uma magnificação de 40x e um campo ocular com diâmetro de 0,5 mm).

Nota 2: O índice de Ki-67 é determinado pela contagem de ao menos 500 células nas regiões de maior atividade mitótica.

Nota 3: O grau final é determinado pelo maior índice de proliferação (entre a contagem mitótica e o Ki-67).

Abreviações: G1, grau 1; G2, grau 2; G3, grau 3; MiNEN, neoplasias mistas neuroendócrinas e não-neuroendócrinas; NEC, carcinoma neuroendócrino; TNE, tumor neuroendócrino.

1.3.2 Heterogeneidade das NEN gastroenteropancreáticas G3

As NEN gastroenteropancreáticas (GEP) G3 constituem um grupo heterogêneo de neoplasias. Foram definidas desde a classificação da WHO de 2010 com base na morfologia e na atividade proliferativa, com um índice de Ki-67 superior à 20%¹⁴. Em 2013, um grupo francês, pela primeira vez, publicou sobre a heterogeneidade entre os NEC e criaram o termo TNE G3¹⁶. Após a confirmação por outros estudos a WHO subclassificou as NEN G3. Primeiro em 2017, para o sítio pancreático, definindo-se os TNE pancreáticos G3 como NEN bem

diferenciadas, com um índice de Ki-67, em geral, entre 20% e 50%; enquanto os NEC têm histologia pouco diferenciada e geralmente índice de Ki-67 maior que 50%¹⁷. Em julho de 2019, essa subclassificação foi expandida para os demais sítios gastrointestinais¹⁵.

Raros estudos retrospectivos sobre NEC e TNE G3 pancreáticos, sugerem que além de entidades com prognóstico distintos elas possuam perfis moleculares também distintos. Os NEC frequentemente possuindo mutações em *TP53* e *Rb*¹⁸ e compartilhando alterações genômicas com a sua contraparte de adenocarcinoma/carcinoma¹⁹⁻²¹. Enquanto os TNE G3 possuem um panorama mutacional que se assemelha aos TNE G1 e G2²¹.

1.4 PROGNÓSTICO

A heterogeneidade das NEN se reflete no distinto prognóstico. A variabilidade do curso clínico depende, entre outros fatores, da origem do sítio primário, da diferenciação histológica e proliferação celular, do estadiamento, da presença de síndromes funcionantes, do comportamento biológico e da disponibilidade de tratamentos.

Uma avaliação patológica acurada é o padrão ouro diagnóstico das NEN. Além disso, representa o primeiro passo para individualizar o manejo. O índice de Ki-67, com valores entre 0 e 100%, representa a proliferação celular com o seu aumento correlacionado com uma maior agressividade tumoral. Em adição, enquanto os TNE possuem um típico padrão organoide de crescimento, com grupos celulares aninhados ou em arranjos pseudo-glandulares, os NEC são pouco diferenciados por definição, resultando em um pior prognóstico. Parcialmente pela sua perda de diferenciação, os NEC são menos propensos a secretar substâncias vasoativas e os pacientes são frequentemente diagnosticados com doença metastática sem a presença de sintomas hormônio relacionados²².

Os NEC podem ser subclassificados em pequenas células ou grandes células. O grupo de pequenas células possuem células com citoplasma escasso e núcleos fusiformes com nucléolos imperceptíveis e cromatina finamente granular, em uma distribuição laminar. O grupo de grande células apresenta morfologia com padrões de ninhos ou trabeculares de células redondas, poligonais, com citoplasma moderado e núcleos grandes, com nucléolos proeminentes e cromatina vesicular¹⁵. A subclassificação NEC entre células pequenas ou células grandes tem pouca relevância clínica atualmente, mas um estudo recente, conduzido com participação do nosso grupo, mostrou que os NEC extrapulmonares de células grandes e

em estágio avançado respondem menos à quimioterapia à base de platina e tem sobrevida mais curta do que a contraparte de células pequenas²³.

1.5 TRATAMENTO

O manejo dos pacientes com NEN GEP G3 representa um desafio clínico devido a sua raridade, agressividade, comum apresentação tardia (casos incuráveis), limitações nas modalidades de imagens e de biomarcadores preditivos, com restritas opções terapêuticas de benefício variado no contexto de doença avançada²⁴.

Os casos de NEC metastáticos, em contraste com as NEN bem diferenciados, frequentemente respondem à quimioterapia baseada em platina, embora seu prognóstico seja reservado, com uma mediana de sobrevida global entre 7 e 11 meses^{25, 26}. O tratamento sistêmico de primeira linha é frequentemente quimioterapia baseada em platina, como extrapolação do tratamento de pacientes com carcinoma de pequenas células pulmonares²⁷⁻²⁹. A platina, seja cisplatina ou carboplatina, é frequentemente associada ao etoposídeo ou ao irinotecano³⁰⁻³³. Estes protocolos são baseados em séries retrospectivas, sendo a maior delas publicada em 2013, com 305 pacientes portadores de NEC gastrointestinais avançados. Esta série nórdica observou que os pacientes com NEN com Ki-67 menores que 55% apresentavam menor taxa de resposta, porém melhor sobrevida que pacientes com NEN com Ki-67 maiores ou iguais a 55%, sugerindo que há subgrupos prognósticos distintos nas NEN G3³⁴.

Os tratamentos baseados em platina para pacientes com NEC extrapulmonares oferecem taxas de resposta que variam entre 36% a 70%, menores do que as encontradas no tratamento dos carcinomas de pequenas células pulmonares, sugerindo uma diferença molecular entre eles³⁵. Embora em ambos as alterações mais frequentes sejam em *TP53* e em *RB1*, notam-se alterações gênicas específicas por sítios tumorais, sugerindo que terapias otimizadas poderão ser sítio-específicas^{35, 36}.

1.6 MEDICINA PERSONALIZADA

O conceito de medicina personalizada inclui o tratamento mais adequado ao paciente específico em uma decisão baseada em genômica³⁷. A oncologia personalizada é o protótipo da medicina personalizada, com o uso de informações moleculares tumorais para guiar o

diagnóstico, prognóstico e tratamento, tornando-se importante área de estudo³⁸. O avanço na compreensão das vias moleculares da carcinogênese e suas respectivas alterações moleculares permitiu o desenvolvimento de terapias alvo específicas, mais eficazes e com menor potencial de toxicidades. Nesse contexto, encontram-se consagradas as terapias como o trastuzumabe (anticorpo monoclonal anti-HER2) utilizado em subtipos de câncer de mama, estômago e cólon; cetuximabe (anticorpo anti-EGFR) em câncer colorretal e de cabeça e pescoço; e o imatinibe (inibidor de tirosina quinase anti-c-Kit) útil em leucemias e tumores estromais gastrointestinais.

O sucesso da oncologia personalizada depende da acurácia de testes diagnósticos para biomarcadores preditivos de benefício. Frequentemente, utilizam-se testes denominados *companion diagnostic*, em que se associa o benefício de um medicamento a um teste específico. Constantes são os esforços para a identificação de biomarcadores e tratamento direcionados, em comparação à terapia convencional não específica^{39, 40}.

Os obstáculos para uma oncologia personalizada incluem desafios científicos como a determinação de quais alterações moleculares apresentam a maior significância clínica, a limitação de efeitos adversos *off-target* das drogas alvo, a identificação de biomarcadores preditores de resposta e os mecanismos de resistência resultante da chamada “pressão clonal” induzida por terapias alvo. Adicionalmente, existem desafios regulatórios que protejam as informações dos pacientes, ao mesmo tempo que encorajem a inovação científica⁴¹. Por fim, estão os desafios de políticas públicas de saúde, que permitam viabilizar o maior benefício e acesso, para o maior número de pacientes.

1.6.1 Oncologia personalizada nas NEN

A raridade das NEN limita a capacidade de desenvolver novas terapias e torna primordial a abordagem da oncologia personalizada. No passado, o tratamento era prioritariamente baseado em quimioterapia com pouca atenção à biologia tumoral. De fato, comparativamente à cânceres mais prevalentes, o estudo molecular das NEN foi limitado por muitos anos, em parte devido a sua raridade. Um fator limitante adicional era a necessidade de quantidade e qualidade adequadas de tecido para análises moleculares de baixo rendimento. Como a grande maioria dos pacientes com NEN G3 se apresentam com doença metastática, o material tumoral comumente obtido é proveniente de biópsias e não de ressecções cirúrgicas, o que reforça as limitações dessas análises teciduais.

1.6.2 Sequenciamento massivo paralelo

Nesse contexto, o advento do sequenciamento paralelo massivo de alto rendimento, conhecido como sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *next generation sequencing*) revolucionou o campo da oncogenética, tornando-se essencial para o melhor entendimento da biologia tumoral. Existem inúmeras plataformas de NGS com diferentes tecnologias de sequenciamento genético. Todas requerem robustas tecnologias de bioinformática para um correto alinhamento das leituras com a sequência de genoma de referência e assim, evitar resultados falso positivos ou negativos. Na prática clínica, é fundamental o conhecimento da biologia molecular do tumor em questão, e possível acionabilidade, ao solicitar o tamanho do teste molecular. Painéis menores frequentemente encontram as necessárias mutações, alterações do número de cópias e rearranjos gênicos, com uma menor proporção de variantes de significado indeterminado. Em contrapartida, os extensos painéis que podem incluir até todo o exoma, ou genoma, tumoral podem ser úteis em tumores muito raros em que as alterações moleculares não são previamente conhecidas. Estes, envolvem um maior custo, bioinformática mais complexa e experts para a interpretação.

Dois pivotais estudos utilizaram a tecnologia NGS para estudar detalhadamente o perfil genômico dos TNE pancreáticos. Em 2011, Jiao et al. sequenciou o exoma de 10 TNE pancreáticos, expandindo a análise das variantes patogênicas em mais 58 casos e comparando com amostras tumorais de adenocarcinoma de pâncreas. Identificou-se frequentes mutações em *MEN1* (44%), *DAXX/ATRX* (43%) e em genes da via mTOR (15%); em contraste, a constante alteração em *KRAS* nos adenocarcinomas pancreáticos não foi encontrada ⁴². Em 2017, Scarpa et al. realizou o sequenciamento do genoma de 102 casos de TNE pancreáticos e, entre outros achados, estabeleceu que as quatro vias principais de carcinogênese seriam a de remodelamento de cromatina, ativação da via mTOR, a de manutenção dos telômeros e a de defeitos do reparo de DNA ⁴³. Enquanto o perfil genômico dos TNE pancreáticos é parcialmente conhecido, existem poucas informações tumorais moleculares dos outros sítios de NEN GEP.

2 JUSTIFICATIVA

Diante de um grupo de doença rara e heterogênea, com variável prognóstico, o perfil molecular pode melhorar tanto a acurácia da classificação das NEN G3 como seu manejo clínico⁴⁴. Nesse contexto, os TNE G3 são um subgrupo ainda mais raro em que dados mais detalhados são necessários para melhor compreender seu perfil clínico e molecular, particularmente entre os TNE G3 não pancreáticos. No entanto, pouca informação existe sobre a carga e perfil mutacional das NEN G3. Adicionalmente, dado que a alta carga mutacional (TMB-h: 10 ou mais mutações por megabase, determinada pelo teste FoundationOne®) atualmente é utilizada em outros países como um fator preditivo para o uso de bloqueadores de correceptores imunes, torna-se importante o conhecimento sobre a frequência da carga mutacional em NEN G3⁴⁵.

Portanto, objetivamos avaliar as características clinicopatológicas e moleculares dos TNE G3 GEP e NEC GEP em uma coorte de pacientes com amostras tumorais submetidas à revisão patológica, tratados no A.C.Camargo Cancer Center.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever as características clinicopatológicas e moleculares dos pacientes com NEN G3 gastrointestinais tratados no A.C.Camargo Cancer Center desde o ano de 2000.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a composição de NEN G3 ao serem reclassificados de acordo com a classificação WHO 2019.
- Avaliar a associação entre os subtipos de NEN G3, após a reclassificação pela WHO 2019, e os desfechos de sobrevida global.

4 MÉTODOS

4.1 TIPO DO ESTUDO

Trata-se de estudo de coorte retrospectivo (por análise de prontuário) de pacientes com NEN GEP G3 que foram atendidos e tratados pela Oncologia Clínica do A.C.Camargo Cancer Center entre janeiro de 2000 e setembro de 2019.

4.2 DESFECHOS

4.2.1 Desfechos primários

Características clínicas e demográficas, histológicas da população e perfil molecular (análise mutacional, carga mutacional, presença de instabilidade de microssatélites) por NGS das amostras tumorais disponíveis.

4.2.2 Desfechos secundários

Sobrevida global: definida como o intervalo entre a data do início do tratamento da doença avançada metastática e o óbito por qualquer causa ou perda de seguimento.

4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Os pacientes elegíveis foram identificados utilizando o descritor “neuroendócrino” no sistema institucional de busca de pacientes, Recruit. Os prontuários eletrônicos, AcProject, Sistemas MV e Tasy, foram utilizados para coletar os dados. A amostragem foi de conveniência e os pacientes consecutivos foram considerados elegíveis se possuísem todos os critérios de inclusão e nenhum dos critérios de exclusão abaixo descritos.

4.3.1 Elegibilidade - Critérios de inclusão

- Maiores de 18 anos.

- Confirmação histológica de NEN G3 (Ki-67 > 20% ou pouco diferenciado) gastrointestinais ou de primário desconhecido, desde que o primário de origem pulmonar possa ser descartado (baseado em exames de imagem e no perfil de imunohistoquímica).
- Estadiamento localmente avançado ou metastático.
- Tratados pela Oncologia Clínica do A.C.Camargo Cancer Center entre janeiro de 2000 e setembro de 2019.
- Material do tumor disponível no serviço de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center.

4.3.2 Elegibilidade - Critérios de exclusão

- Pacientes com tumores mistos neuroendócrinos não-neuroendócrinos (MiNEN).
- Pacientes que realizaram apenas consulta de segunda opinião, sem seguimento ou tratamento cujos dados não estejam disponíveis para a coleta.

4.4 DESENHO DO ESTUDO

Estudo retrospectivo, unicêntrico, com coleta de dados dos prontuários médicos eletrônicos e revisão de material anatomopatológico.

4.4.1 Coleta de variáveis

Dados clínicos coletados:

- Dados demográficos (idade ao diagnóstico, sexo)
- Dados clínicos (performance status ao início do tratamento definido pelo *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG))
- Presença de síndrome funcionante
- História de tabagismo
- Comorbidades (definido como condição clínica que necessite de terapia medicamentosa e avaliado pelo escore Charlson)
- Índice de massa corpórea (IMC) ao diagnóstico
- Presença de síndrome hereditária conhecida

Dados patológicos coletados:

- Localização do sítio primário do tumor
- Presença e sítios de metástases
- Índice de Ki-67
- Diferenciação tumoral
- Tamanho celular (NEC)

Dados de imagem coletados:

- *Fluorodeoxyglucose [18F] positron emission tomography* (FDG-PET)
- Imagem funcional de receptor de somatostatina (SRI) (positiva ou negativa por avaliação qualitativa): PET-CT 68Ga, ou Octreoscan®

Dados do tratamento:

- Tipo de tratamento (cirurgia, radioterapia, tratamento sistêmico); quantas e quais linhas foram realizadas
- Razões para descontinuação

Dados moleculares:

- Mutações somáticas, status de instabilidade de microssatélites e carga mutacional (avaliadas pelo teste FoundationOne®)

Dados de seguimento:

- Data do óbito, causa da morte, ou data da última visita de seguimento

4.4.2 Avaliação patológica

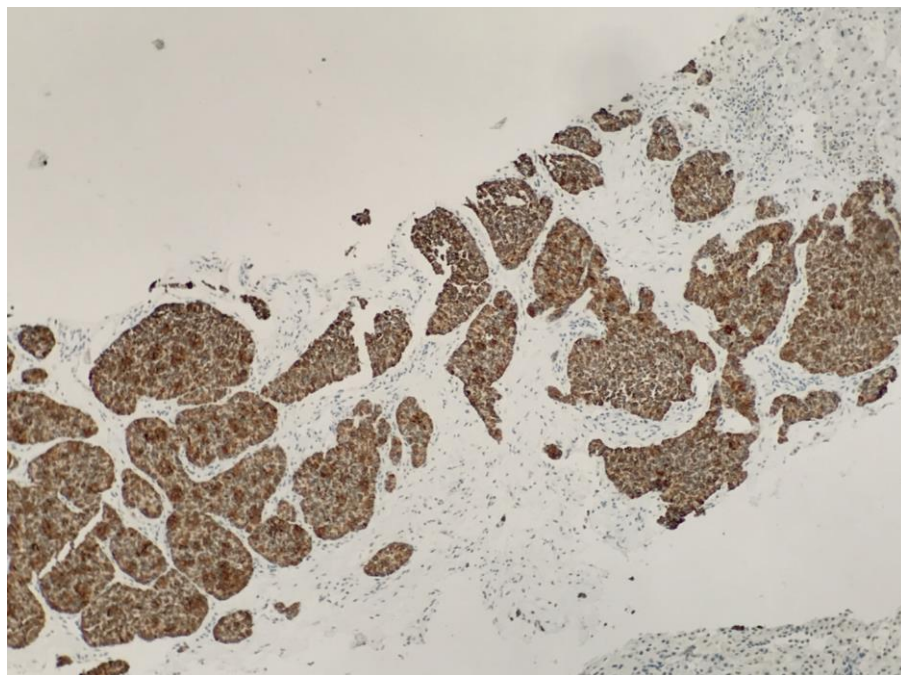
Todos os casos com lâminas de tumor disponíveis foram revisados com foco na diferenciação histológica pela L.C.L.C., patologista com experiência em NEN, e reclassificados de acordo com a classificação da WHO 2019¹⁵. A classificação WHO 2019 histologicamente gradua as NEN GEP baseando-se na morfologia e atividade proliferativa.

A atividade proliferativa foi avaliada através do índice de Ki-67. Ki-67 é uma proteína nuclear expressa em células em proliferação (fases S e M do ciclo celular) e é identificada através do anticorpo murino anti-Ki-67, MIB-1. Para a definição do índice de Ki-67 avaliou-se a porcentagem de células com expressão positiva pelo MIB-1 de um total de 500 a 2000 células, avaliadas em locais de *hot spots* (áreas com alta expressão de Ki-67). As NEN com Ki-67 maior que 20% são consideradas como NEN de alto grau, ou G3 (Figura 1b).

As NEN de alto grau (Ki-67 > 20% e/ou contagem mitótica > 20/2 mm²) foram subsequentemente classificadas em TNE G3, se bem diferenciadas, ou NEC, se com pobre

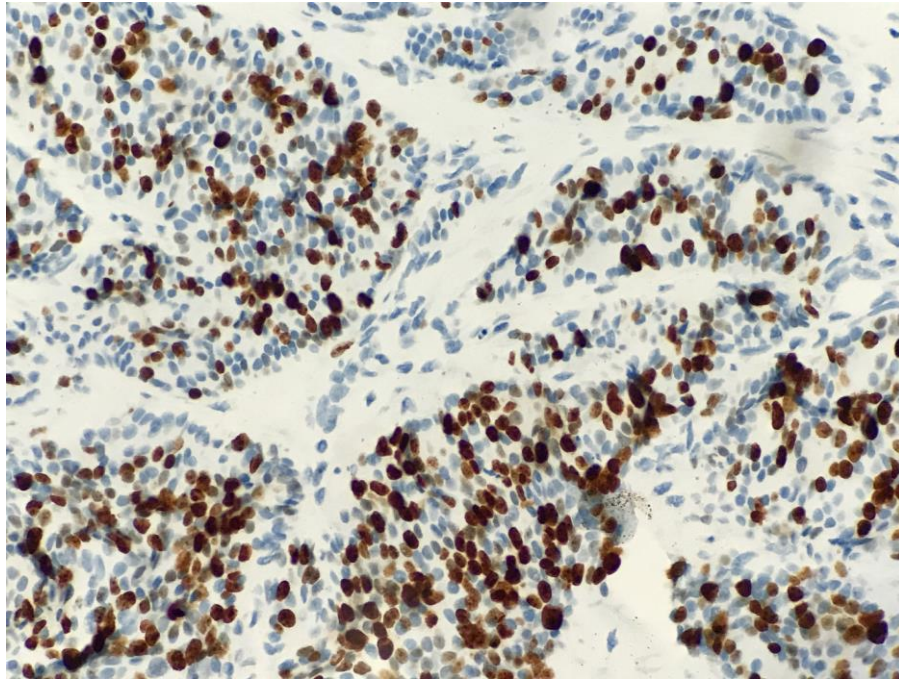
diferenciação. Os TNE G3 possuem células com núcleos redondos ou ovais com cromatina em “sal e pimenta” e mínima a moderada atipia. Possuem um padrão de crescimento do tipo organoide, com ninhos bem diferenciados ou com arranjos pseudo-glandulares, justaposição de capilares e sem necrose (Figuras 1c e 1d).

Os NEC são de pobre diferenciação e são, por definição, sempre de alto grau. Possuem células atípicas, altamente proliferativas, com núcleos pleomórficos e angulados, com borda irregular e intensa hiperchromasia. As figuras de apoptose e de mitose são mais facilmente identificáveis e a presença de necrose, embora não seja critério exigido para graduação histológica nos tumores gastroenteropancreáticos, sugere comportamento agressivo e de alto grau. De forma geral, apresentam aspecto infiltrativo. À semelhança da contraparte pulmonar, os NEC podem ser ainda subclassificados em NEC de pequenas ou grandes células. Na morfologia, o grupo de pequenas células tem uma camada difusa de células com citoplasma escasso e núcleos fusiformes com nucléolos imperceptíveis e cromatina finamente granular. O grupo de grandes células apresenta uma morfologia com padrões semelhantes à ninhos ou trabéculas de células redondas/poligonais, com quantidade moderada de citoplasma e núcleos grandes com nucléolos proeminentes e cromatina vesicular. A tabela 2 seleciona as principais de características histológicas dos subtipos de NEN de alto grau.



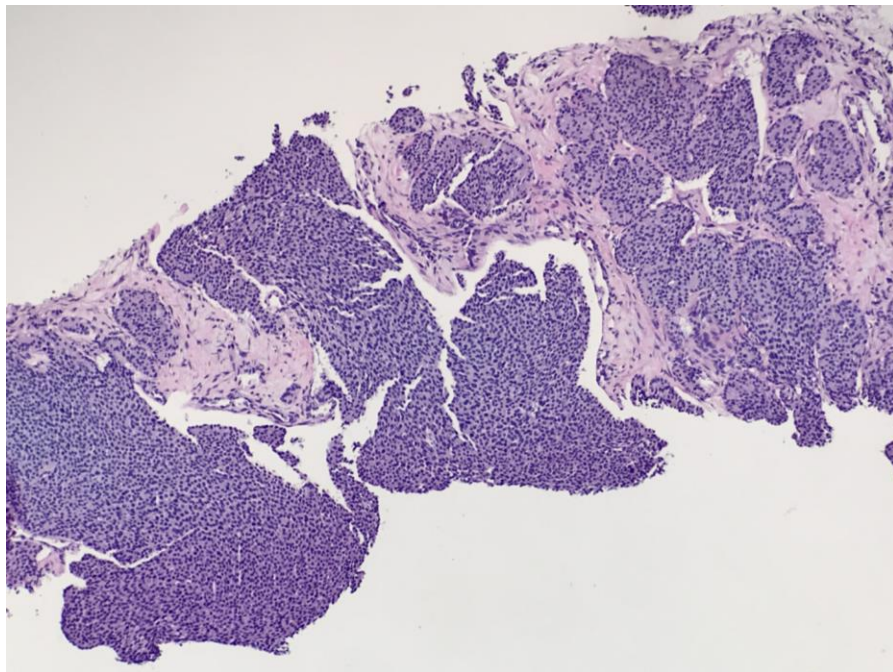
Abreviações: G3, grau 3; TNE, tumor neuroendócrino

Figura 1a – TNE pancreático G3 com cromogranina A positiva



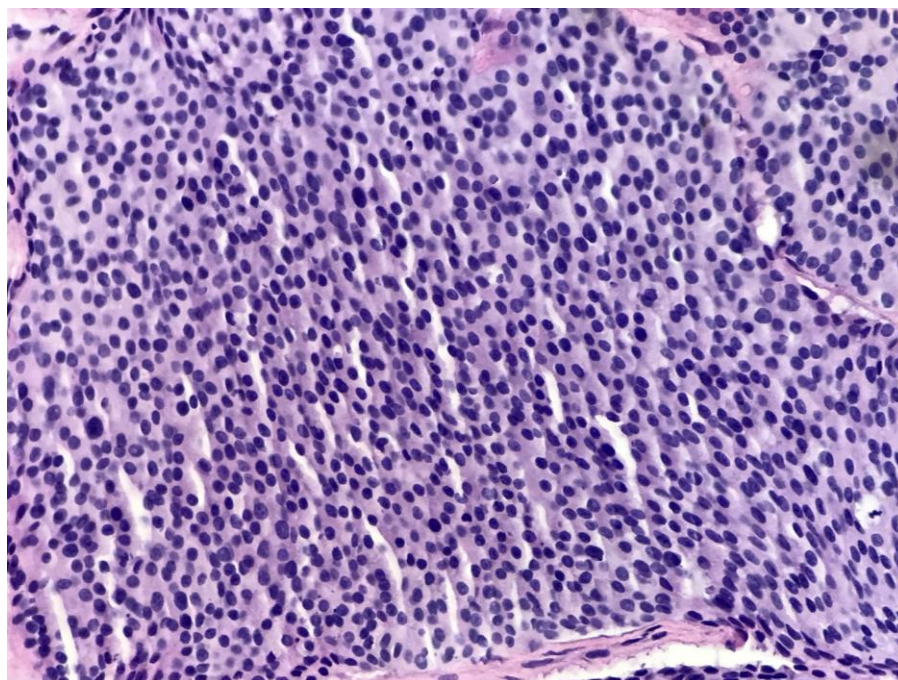
Abreviações: G3, grau 3; TNE, tumor neuroendócrino.

Figura 1b – TNE pancreático G3 com Ki-67 de 60%



Abreviações: G3, grau 3; HE, hematoxilina e eosina; TNE, tumor neuroendócrino.

Figura 1c – TNE pancreático G3 em HE – aumento de 10x



Abreviações: G3, grau 3; HE, hematoxilina e eosina; TNE, tumor neuroendócrino.

Figura 1d – TNE pancreático G3 em HE – aumento de 40x

Tabela 2 – Características histológicas dos NEN G3

	Nucléolos	Núcleos	Células	Atipias	Necrose	Padrão de crescimento	
TNE G3	Cromatina; sal e pimenta	Redondos/ Ovais	Redondas/ Monótona	Mínima/ Moderada	geralmente ausente	Organoide	
NEC	Pequenas células	Imperceptíveis	Fusiformes/ Hiper cromático	Camada difusa c/ citoplasma escasso	Presente	+/-	Aspecto infiltrativo
	Grandes células	Proeminentes	Grandes/ Hiper cromático	Pleomórficas	Presente	+/-	Aspecto infiltrativo

Abreviações: G3, grau 3; NEC, carcinoma neuroendócrino; NEN, neoplasias neuroendócrinas; TNE, tumor neuroendócrino.

4.4.3 Avaliação molecular

A avaliação molecular foi realizada em material de parafina arquivado utilizando-se o teste FoundationOne®. Este teste foi realizado majoritariamente com o objetivo exclusivo de pesquisa, tendo sido financiado como fomento de pesquisa pela empresa Roche-Genetech. A esses, somaram-se alguns casos em que o teste foi solicitado como rotina de assistência aos pacientes com NEN G3.

O teste FoundationOne® está comercialmente disponível no Brasil (aprovado pela ANVISA) e que foi desenvolvido para fornecer informações capazes de auxiliar o médico na seleção de tratamento, além de facilitar a busca de possíveis estudos clínicos em andamento. Este teste é rotineiramente solicitado por oncologistas de todo Brasil, incluindo no A.C.Camargo Cancer Center, para auxiliar decisão terapêutica de pacientes com tumores sólidos. O DNA extraído dos blocos de parafina foram analisados através de NGS. Este teste avalia 324 alterações genômicas somáticas comuns nos cânceres humanos (ex., mutações, ampliações/alterações no número de cópias, rearranjos/fusões), a carga mutacional (cobertura de 0,8 megabase de região codificante do genoma tumoral, capturando mutações sinônimas e não sinônimas) e presença de alta frequência de instabilidade de microssatélite (MSI-H). A lista completa do painel testado encontra-se disponível na página https://www.foundationmedicine.com.br/content/dam/rfm/br_v2-pt_br/downloads/F1CDx_TechInfo_09-03_Portuguese2.pdf.

No teste FoundationOne®, a MSI-H é determinada por um escore global baseado na análise de 95 *loci* (não usando os 5 de 7 MSI *loci* descrito comumente em diretrizes clínicas). Cada amostra foi classificada como MSI-H, estável (MSS) ou desconhecido – caso o status de MSI não puder ser determinado. O limiar entre MSI-H e MSS foi determinado previamente por concordância analítica entre imunohistoquímica e por reação em cadeia da polimerase realizada em amostras teciduais de cancer uterinos e colorretais⁴⁶. A carga mutacional tumoral (TMB) medida pelo FoundationOne® mostrou boa correlação com o TMB medido pelo sequenciamento de todo o exoma⁴⁷. As mutações são comumente reportadas como variáveis binárias; na época do estudo, a frequência alélica das mutações encontradas não eram descritas. Não descrevemos as variantes de significado indeterminado. Todo material de tumor e/ou tecido excedente foi retornado ao solicitante, que neste caso, são os investigadores oncologistas e patologistas do A.C.Camargo Cancer Center.

4.5 CONSIDERAÇÕES ESTATÍSTICAS

O tamanho da amostra foi determinado com base em conveniência e viabilidade a partir de 2000, considerando a raridade das NEN G3. Estimamos incluir aproximadamente 60 pacientes.

Estatística descritiva foi utilizada para reportar as características da população. As variáveis categóricas foram expressas como porcentagens e as variáveis contínuas foram expressas com as medianas e respectivos intervalos. O teste exato de Fisher foi utilizado para as variáveis categóricas e os testes t-test ou Mann-Whitney U para as variáveis contínuas, conforme apropriado, para comparar características demográficas e clínicas dos pacientes com TNE G3 e NEC. A presença de mutações de acordo com o grupo de NEN G3 e mecanismo gênico foram apresentadas no formato de *heatmap*. Os tipos de tratamentos sistêmicos em primeira e segunda linha foram apresentados com o modelo de diagrama de *Sankey*.⁴⁸

A sobrevida global foi calculada a partir do início do tratamento sistêmico até a data de morte por qualquer causa ou perda de seguimento. A sobrevida global foi estimada pelo método de Kaplan-Meier e comparações foram feitas com o teste de log-rank. O tempo de seguimento foi calculado pelo método Kaplan-Meier reverso. A regressão univariada de Cox foi utilizada para avaliar o impacto de relevantes covariáveis clinicopatológicas, como o sítio tumoral primário (pancreático vs. não-pancreático), presença de metástases (ou localmente avançado), comorbidades (escore Charlson) e diferenciação tumoral (bem vs. pouco diferenciado) na sobrevida. Variáveis com um p valor < 0.1 nas análises univariadas foram introduzidos no modelo multivariável de Cox. Análises de variáveis tempo-para-evento utilizaram *hazard ratio* (HR) com intervalos de confiança (IC) de 95%. Valores de p bicaudados $< 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O término do seguimento foi em 1 de setembro de 2019. Todos os testes estatísticos foram feitos com o programa estatístico Stata IC/16.0 (StataCorp, College Station, Estados Unidos).

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

O trabalho foi realizado de acordo com os aspectos éticos orientados pela Declaração de Helsinki em 1989 e pela resolução 196/96 sobre pesquisas envolvendo seres humanos do Conselho Nacional de Saúde. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C.Camargo Cancer Center / Fundação Antônio Prudente, sob o número 2642/18 (Anexo 1). Os dados dos pacientes foram tratados de forma anônima. O único risco associado a este estudo foi a possível perda de confidencialidade de dados, pelo qual o máximo de cuidado foi tomado para não ocorrer. Para isso, identificadores diretos, como nome completo, siglas, e data de nascimento não foram inseridos no banco de dados; todo e

qualquer dado que pudesse levar à identificação dos pacientes foi codificado, fazendo com que o risco de perda de confidencialidade fosse mínimo. Somente os investigadores tiveram acesso ao banco de dados do estudo, armazenado em computador protegido por senha individual e, tendo sido posteriormente inseridos na plataforma institucional RedCap.

As análises moleculares foram realizadas por teste diagnóstico comercialmente disponível, Foundation One® e não como teste exploratório de pesquisa. O patrocinador Roche-Genetech custeou os testes FoundationOne®, não tendo nenhum envolvimento no desenho, análise dos dados, análise estatística e interpretação dos resultados, também não possuindo qualquer acesso aos dados clínicos dos pacientes.

O estudo foi conduzido em concordância com o protocolo internacional de diretrizes para boas práticas clínicas e com as normas nacionais vigentes de pesquisa, incluindo a resolução do Conselho Nacional de Saúde número 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde.

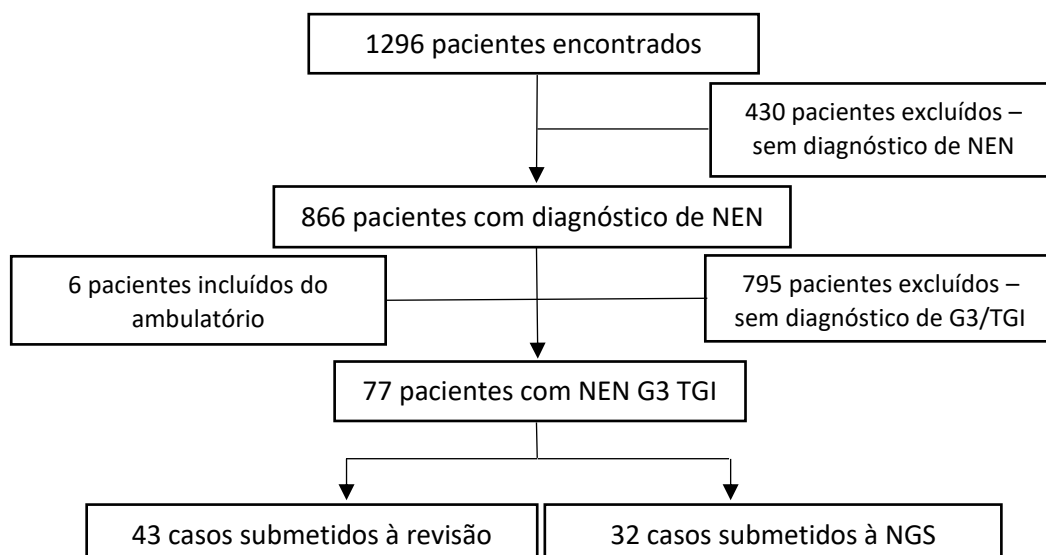
4.7 CUSTOS

A parte de coleta de dados e análise estatística foi realizada pelos investigadores e por isso, sem custo. O custo do teste diagnóstico Foundation One® para 60 amostras de tumor foram custeados como fomento de pesquisa pela empresa Roche-Genentech. A empresa Roche-Genetech também forneceu fundos para custeio de separação e revisão dos casos pela Anatomia Patológica e taxas administrativas.

5 RESULTADOS

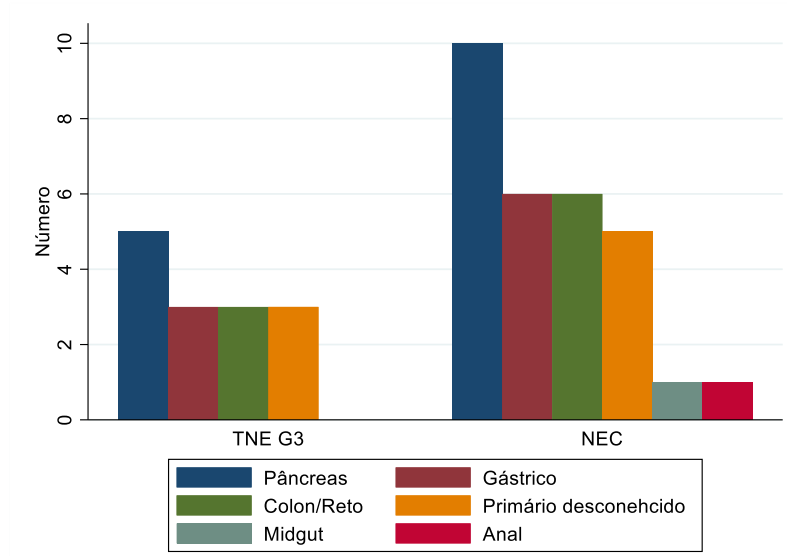
5.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

Ao todo, 1.296 pacientes foram identificados e triados (Figura 2). Noventa e quatro por cento destes não preencheram os critérios de elegibilidade e foram excluídos. No geral, 77 pacientes foram elegíveis e tiveram seus dados coletados. A maioria dos pacientes (n=67, 87%) foram diagnosticados a partir de 2010. Cinquenta e quatro (70%) pacientes abriram o quadro com doença metastática. A localização primária mais frequente foi pancreática, tanto para os TNE G3 (36%) quanto para os NEC (34%) (Figura 3). Não houve diferença de positividade entre o PET-FDG e a imagem funcional para receptores de somatostatina entre os TNE G3 e os NEC. História de tabagismo foi alta (próxima a 70%) para ambos os grupos. Dentre 77 pacientes, 43 (56%) tiveram amostras teciduais disponíveis para a revisão patológica e possuem suas características descritas na Tabela 2.



Abreviações: G3, grau 3; NEN, neoplasias neuroendócrinas; NGS, *next generation sequencing*; TGI, trato gastrointestinal.

Figura 2 - Fluxograma com descrição dos casos incluídos no estudo



Abreviações: TNE, tumor neuroendócrino; NEC, carcinoma neuroendócrino.

Figura 3 - Localização do tumor primário

5.2 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS E MOLECULARES

Dentre os 43 casos com amostras teciduais adequadas para a revisão patológica: 29 (67%) eram NEC e 14 (33%) eram TNE G3, com uma mudança do diagnóstico inicial de 23% (10 dos 43 casos revisados foram inicialmente classificados como NEC foram reclassificados como TNE G3). A mediana de Ki-67 para os TNE G3 e NEC foram 45% e 75% ($p=0.06$), respectivamente, com casos de TNE G3 com Ki-67 até de 80% (Figura 4). Dois terços (66%) dos NEC possuíam histologia de grandes células.

Tabela 3 - Características clinicopatológicas e associação com TNE G3 e NEC

	TNE G3	NEC	NEN G3	p-valor
Total; n (%)	14 (33)	29 (67)	43 (100)	-
Idade, anos; mediana (intervalo)	55 (32-74)	57 (26-91)	56 (26-91)	0.32
Sexo, masculino; n (%)	8 (57)	18 (62)	26 (60)	0.76
Sítio primário; n (%)				
Pâncreas	5 (36)	10 (34)	15 (35)	-
Gástrico	3 (21)	6 (21)	9 (21)	
Colon/Reto	3 (21)	6 (21)	9 (21)	
Desconhecido	3 (21)	5 (17)	8 (19)	
Midgut	-	1 (3)	1 (2)	
Anal	-	1 (3)	1 (2)	
Metastático ao diagnóstico; n (%)	8 (57)	20 (69)	28 (65)	0.33
0	11 (79)	18 (62)	29 (67)	0.44
ECOG PS; n (%)	1	3 (21)	9 (31)	
2	-	2 (7)	2 (5)	
IMC, mediana	25	24	24	0.80
Comorbidades, Charlson; mediana	7	7	7	0.52
Tabagismo/Tabagismo prévio; n (%)	7 (70)	14 (67)	21 (68)	0.85
Síndrome funcionante, n (%)	1 (7)	2 (7)	3 (7)	0.70
Síndrome genética, n (%)	2 (14)	0 (0)	2 (5)	0.10
SRI, positividade; n (%)	5/7 (71)	9/13 (69)	14/20 (70)	0.67
FDG-PET, positividade; n (%)	6/9 (67)	12/16 (75)	18/25 (72)	0.66
NEC subtipo, n (%)				
Pequenas células	-	10 (34)	-	-
Grandes células	-	19 (66)	-	-
Ki-67, mediana (intervalo)	45 (25-80)	75 (25-100)	60 (25-100)	0.06

Nota 1: Ambos os casos com síndrome genética eram MEN-1, com um Ki-67 de 25% e 30%.

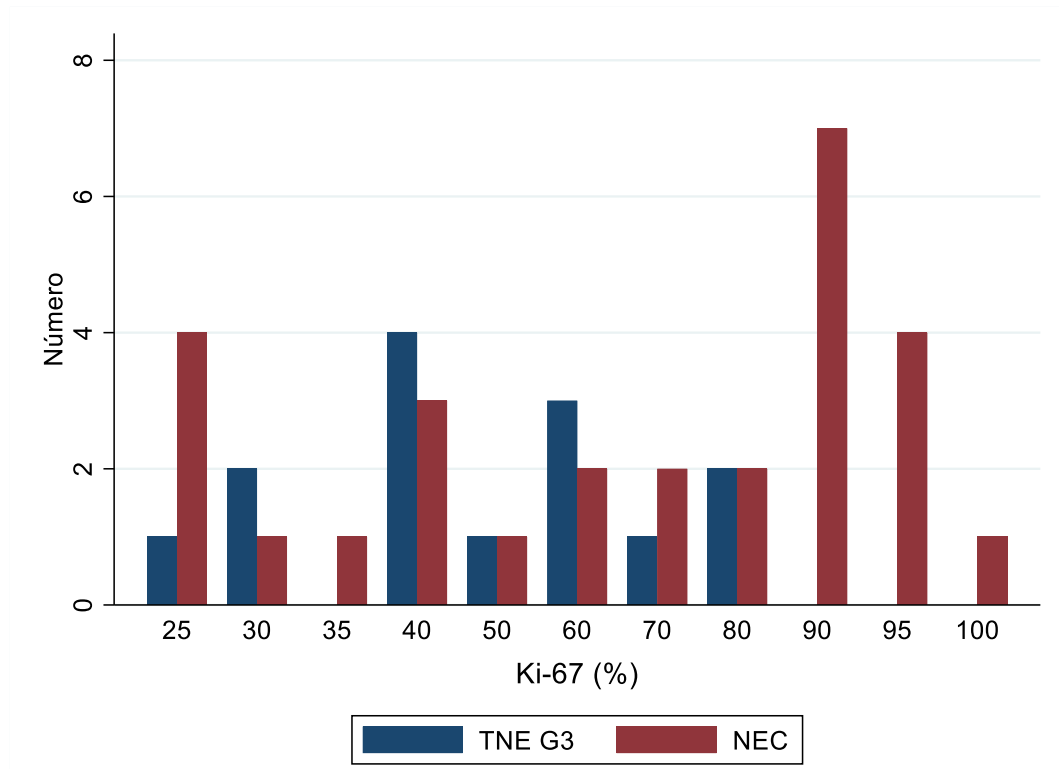
Nota 2: SRI: imagem funcional de receptor de somatostatina por avaliação qualitativa.

Nota 3: As porcentagens podem não somar 100 devido ao arredondamento.

Abreviações: ECOG, *Eastern Cooperative Oncology Group*; IMC, índice de massa corpórea; FDG-PET, tomografia por emissão de pósitrons 18F-fluorodeoxiglicose; NEC, carcinoma neuroendócrino; NEN, neoplasias neuroendócrinas; TNE, tumor neuroendócrino; PS, performance status; SRI, imagem funcional de receptor de somatostatina.

Do total de 77, 32 (42%) casos apresentaram material suficiente para a realização de NGS, sendo 21 casos de NEC e 11 de TNE G3. A carga mutacional tumoral foi de 5 (0-67) mutações por megabase entre os NEC e 4,5 (0-9) entre os TNE G3 ($p=0.63$). Houve 3 (14,3%) casos com alta frequência de instabilidade de microssatélite entre os NEC (2 de origem colônica e 1 gástrico), mas zero entre os TNE G3 ($p=0.53$). Um caso de MSI-H não apresentou mutações deletérias nos genes de reparo de DNA, sugerindo eventos epigenéticos como causa desse fenótipo. Entre os TNE G3, as variantes patogênicas mais comuns foram em *TP53* (27%), *CDKN2A*, *ARID1A*, e *MEN1* cada com 18%. Em contraste, no grupo de NEC, as alterações mais prevalentes foram em *TP53* (71%), *RB1* (38%) e *PTEN* (29%). A Tabela 3 resume os principais

genes mutados, a carga mutacional tumoral e a presença de instabilidade de microsatélite entre as NEN G3. A Figura 5 detalha os tipos de mutações e a presença de amplificações gênicas por NEN G3, agrupando as alterações gênicas por mecanismos envolvidos.



Nota 1: Um caso de NEC sem índice de Ki-67.

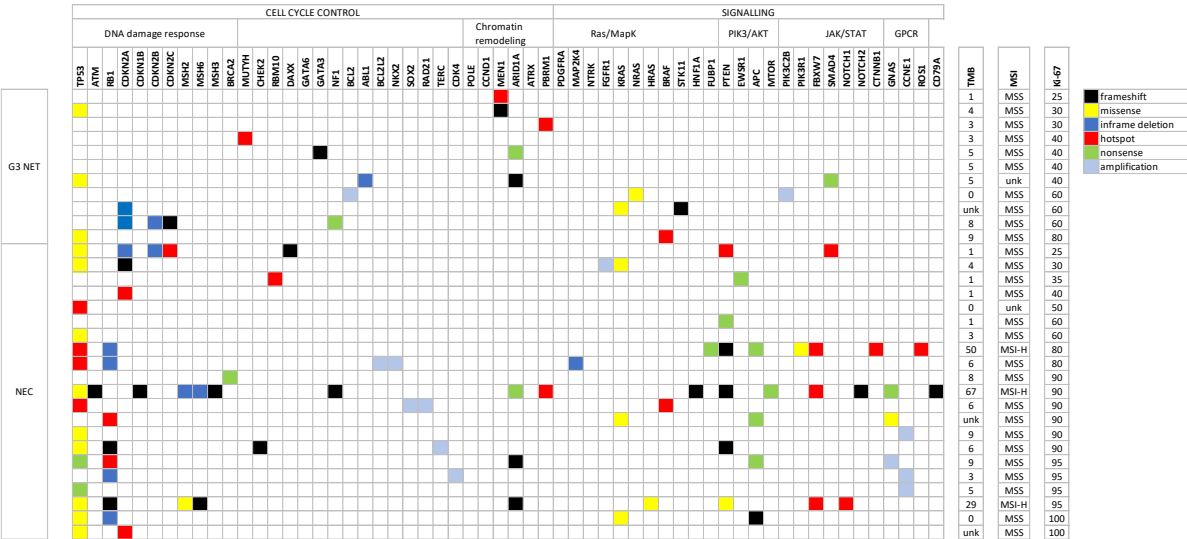
Abreviações: TNE G3, tumor neuroendócrino grau 3; NEC, carcinoma neuroendócrino.

Figura 4 - Descrição do Ki-67 e da diferenciação por TNE G3 e NEC

Tabela 4 - Perfil molecular

	TNE G3	NEC	NEN G3
Mutações; n (%)	11 (100)	21 (100)	32 (100)
<i>TP53</i>	3 (27)	15 (71)	18 (56)
<i>RB1</i>	-	8 (38)	8 (25)
<i>CDKN2A</i>	2 (18)	4 (19)	6 (19)
<i>PTEN</i>	-	6 (29)	6 (19)
<i>ARID1A</i>	2 (18)	3 (14)	5 (16)
<i>APC</i>	-	4 (19)	4 (13)
<i>KRAS</i>	1 (9)	3 (14)	4 (13)
<i>CCNE1</i>	-	3 (14)	3 (9)
<i>FBXW7</i>	-	3 (14)	3 (9)
<i>GNAS</i>	-	3 (14)	3 (9)
<i>MSH2</i>	-	2 (10)	2 (6)
<i>MSH6</i>	-	2 (10)	2 (6)
Carga mutacional			
Desconhecida; n (%)	1 (9)	2 (10)	3 (9)
Mediana (intervalo)	4.5 (0-9)	5 (0-67)	5 (0-67)
MSI			
Desconhecida; n (%)	1 (9)	1 (5)	2 (6)
MSS; n (%)	10 (91)	17 (81)	27 (81)
MSI-H; n (%)	0 (0)	3 (14)	3 (9)

Nota 1: Um caso com mutação em MSH2, MSH6, e em MSH3.
Abreviações: NEC, carcinomas neuroendócrinos; NEN G3, neoplasias neuroendócrinas grau 3; MSI, instabilidade de microssatélite; MSI-H, alta frequência de instabilidade de microssatélite; MSS, estabilidade de microssatélite.

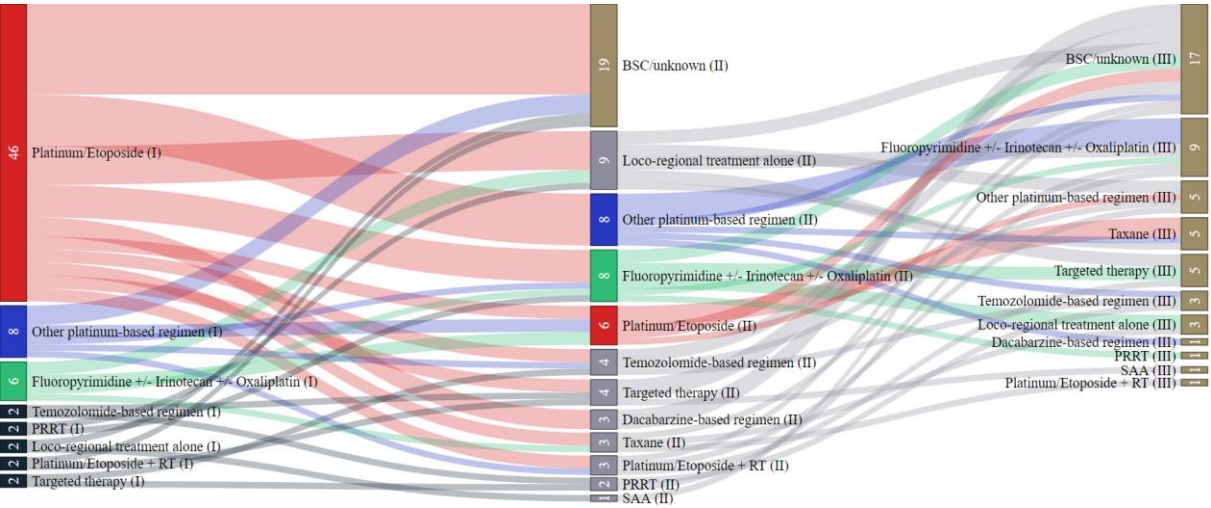


Abreviações: NEC, carcinomas neuroendócrinos; MSI, instabilidade de microssatélite; MSI-H, alta frequência de instabilidade de microssatélite; MSS, estabilidade de microssatélite; TMB, carga mutacional tumoral; TNE G3, tumor neuroendócrino grau 3.

Figura 5 - Heat map descrevendo alterações genômicas

5.3 MANEJO CLÍNICO E DESFECHOS DE SOBREVIDA

De um total de 77, 23 (30%) pacientes eram não metastáticos ao diagnóstico e 16 (70%) receberam um tratamento com intuito curativo com terapia adjuvante, metade dos quais recebendo terapia à base de platina e etoposídeo. Cinquenta e quatro (70%) eram metastáticos ao diagnóstico e um total de 70 (91%) se tornaram metastáticos durante o curso de sua doença. De todos os 70 pacientes que receberam tratamento sistêmico, 19 (27%) receberam apenas uma linha de tratamento. Quimioterapia com platina e etoposídeo foi a linha de quimioterapia mais utilizada (66%, 46 de 70), tanto para TNE G3 quanto para NEC (Figuras 6a, 6b e 6c). Três (4%) pacientes, todos com NEC, foram tratados diretamente com cuidados clínicos exclusivos devido à pobre performance clínica.



Esta figura demonstra a sequência de estratégias de tratamento aplicada para cada paciente na primeira, segunda e terceira linha, se aplicável. Casos submetidos à revisão patológica. A largura das linhas é proporcional ao número de pacientes que receberam o tratamento específico. BSC, tratamento clínico exclusivo; GEP, gastroenteropancreáticos; NEC, carcinoma neuroendócrino; PRRT, terapia com radionuclídeo para receptor de peptídeo; RT, radioterapia; SAA, análogo de somatostatina; Unknown, paciente faleceu, perdeu seguimento, ou informação sobre o tratamento está faltando.

Figura 6a - Diagrama Sankey de tratamentos sequenciais de pacientes com NEN G3

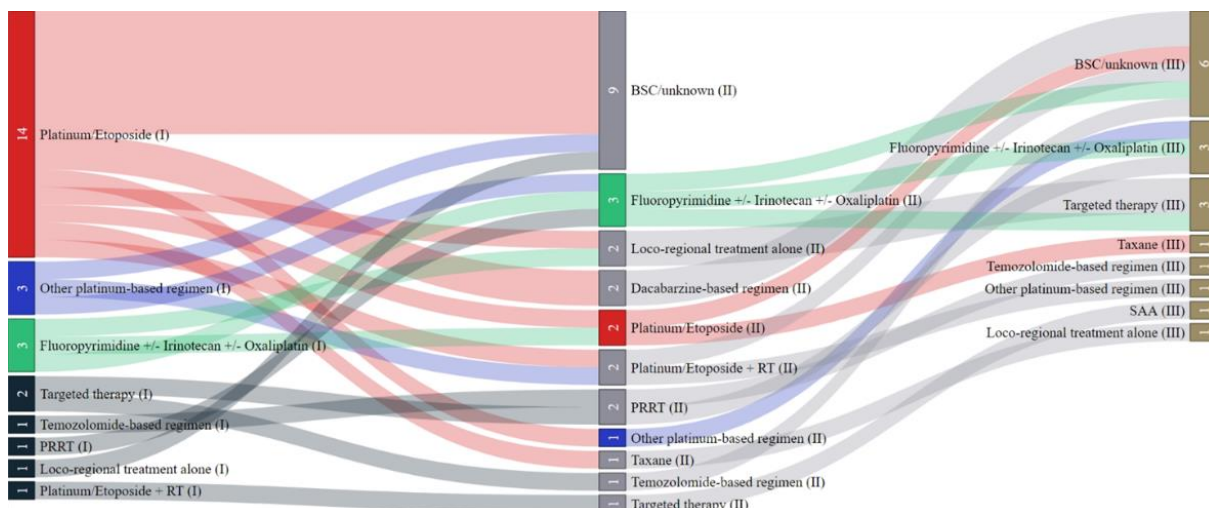


Figura 6b - Diagrama *Sankey* de tratamentos sequenciais de pacientes com NEC

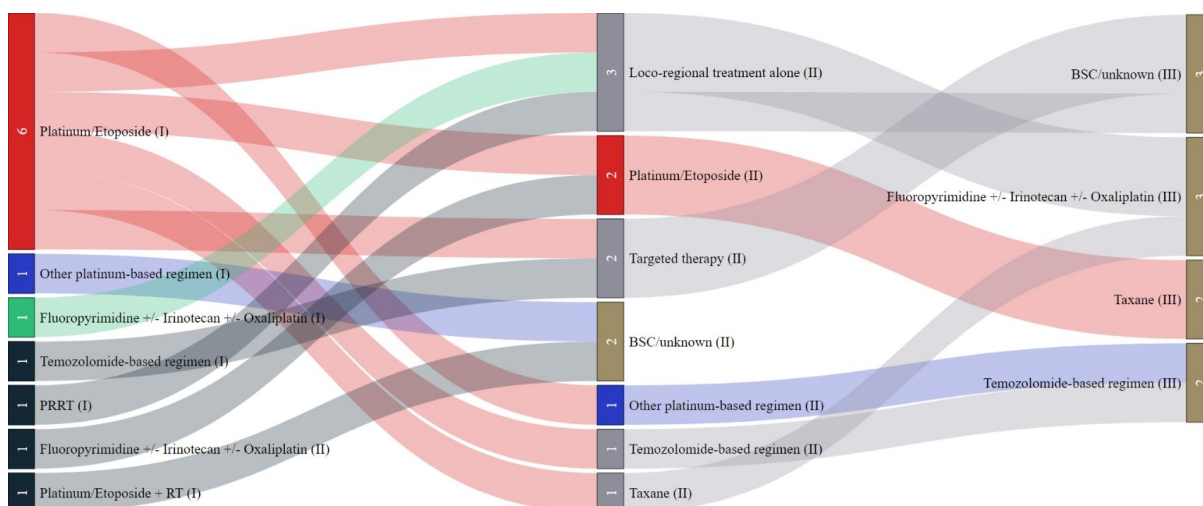
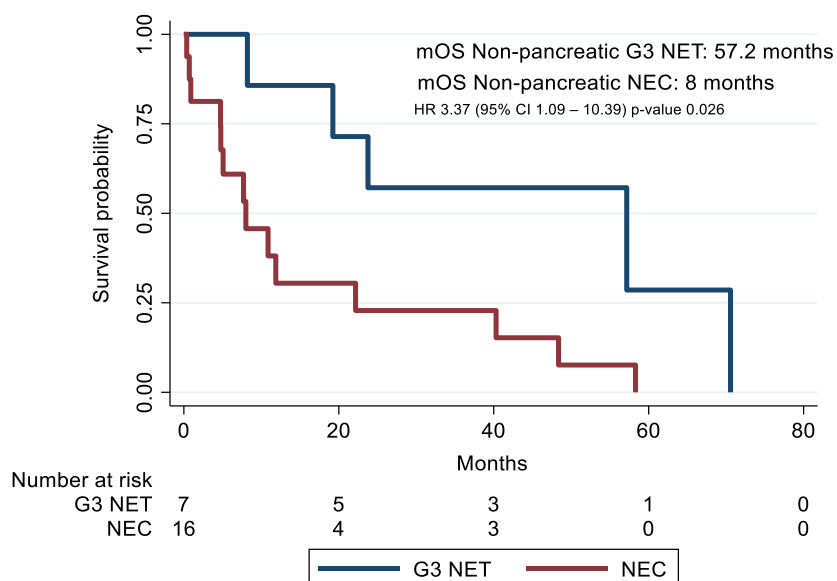


Figura 6c - Diagrama *Sankey* de tratamentos sequenciais de pacientes com TNE G3

Em uma mediana de seguimento de 44 meses, a mediana de sobrevida global foi de 22,2 (IC 95% 8,2 – 45,1) meses. A mediana de sobrevida global entre pacientes com TNE G3 e NEC foram de 55,6 (IC 95% 6,7 – NA) e 11,9 (IC 95% 6,1 – 25) meses, respectivamente (HR 2,78 [IC 95% 1,09 – 7,11], $p=0,042$).

Considerando os NEN não-pancreáticos a diferença em sobrevida global foi ainda maior entre os TNE G3 e NEC, 57,2 (IC 95% 8,2 – NA) meses e 8 (IC 95% 4,7 – 22,2) meses, respectivamente (HR 3,37 [IC 95% 1,09 – 10,39], $p=0,026$) (Figura 6). Na regressão multivariáveis de Cox, apenas a diferenciação celular se manteve como um significativo risco de morte (HR-ajustado 2,90 NEC vs. TNE G3; $p=0,03$) (Tabela 4).



Abreviações: HR, hazard ratio; IC, intervalo de confiança; IMC, índice de massa corpórea; NEC, carcinoma neuroendócrino; TNE G3, tumor neuroendócrino grau 3.

Figura 7 - Não-pancreático: TNE G3 vs. NEC – estimativas para sobrevida global

Tabela 5 - Resultados de análises univariadas e multivariáveis por regressão de Cox para sobrevida global

Covariáveis	Univariável	Multivariáveis	
	p-value	HR (IC 95%)	p-valor
Sexo	0.28	-	-
IMC; ≥ 30 vs. < 30	0.26	-	-
Charlson; ≥ 6 vs. < 6	0.41	-	-
Não-pancreático vs. pancreático	0.60	1.46 (0.57-3.73)	0.43
Metastático vs. Não-metastático	0.93	0.84 (0.33-2.12)	0.71
NEC vs. TNE G3	0.03	2.90 (1.13-7.43)	0.03

Abreviações: HR, hazard ratio; IC, intervalo de confiança; IMC, índice de massa corpórea; NEC, carcinoma neuroendócrino; TNE G3, tumor neuroendócrino grau 3.

6 DISCUSSÃO

Esta coorte retrospectiva, unicêntrica, demonstrou que há uma evidente diferença entre os TNE G3 e NEC GEP com relação às características clinicopatológicas e moleculares, reforçando que esses são dois grupos distintos de neoplasias. A mediana de sobrevida foi menos de um ano entre os pacientes com NEC e quase 5 anos entre os com TNE G3. Enquanto mutações em *TP53* foram as alterações moleculares mais encontradas em ambos os grupos, elas ocorreram em proporções distintas, encontradas em 71% dos NEC e em 27% dos TNE G3. Mutações em *RB1*, *PTEN*, e instabilidade de microssatélites foram exclusivamente encontradas em NEC. A mediana de carga mutacional foi baixa e semelhante entre NEC e TNE G3, mas alta carga mutacional foi encontrada em três casos devido à instabilidade de microssatélites. Adicionalmente, a revisão patológica levou a uma mudança em 23% da classificação inicial de NEN G3, com casos de NEC sendo reclassificados como TNE G3. Exceto pela instabilidade de microssatélites em 14% dos casos de NEC, a avaliação de mutações somáticas com um painel NGS não identificou alterações moleculares em NEN G3 que pudessem ser utilizadas como alvo terapêutico.

A diferença em sobrevida entre os grupos distintos de NEN G3 está em concordância com o de estudos pivotais demonstrando a importância clínica da avaliação da diferenciação morfológica⁴⁹⁻⁵¹. Em nosso estudo, a mediana de sobrevida global foram 55,6 meses para os pacientes com TNE G3 e aproximadamente um ano para os com NEC, o que foi independente do sítio primário (pancreático vs. não pancreático) na análise por regressão de Cox. De modo semelhante, um estudo nórdico com 196 pacientes encontrou uma mediana de sobrevida de 33 meses para os pacientes com TNE G3 e também de 11 meses para os pacientes com NEC⁵².

Os dados clinicopatológicos desta série estão em consonância com outros estudos ocidentais. Embora tenha sido encontrado uma diferença significativa entre a mediana de Ki-67 entre os TNE G3 (45%) e NEC (75%) ($p=0.06$), houve casos de TNE G3 com Ki-67 até de 80% (Figura 1), o que também foi relatado em outros estudos⁵³. Da mesma forma, observamos que os TNE G3 podem ser funcionalmente positivos tanto para PET-FDG quanto para receptores de somatostatina⁵³. A ausência de diferença entre a positividade nas imagens com receptores de somatostatina foram provavelmente resultantes do pequeno tamanho amostral. Nossos achados de frequente história de tabagismo (quase 70%) também foi encontrada em uma

coorte prospectiva em que 57% dos pacientes com NEC possuíam história tabágica contrastando com 37% entre a coorte com TNE G1-2⁵⁴.

A alta frequência de alterações encontradas em *TP53* e em *RB1* nos NEC são consistentes com uma revisão sistemática sobre alterações moleculares em NEC GEP que evidenciou que alterações no gene *TP53* e na via *Rb/p16/ciclina D1* são frequentemente encontradas, independente do sítio primário¹⁸. Adicionalmente, a patogênese molecular dos NEC se assemelha à dos carcinomas não neuroendócrinos que surgem no mesmo sítio anatômico.

Instabilidade de microssatélite foi encontrada em apenas pacientes com NEC. Outro recente estudo encontrou 7% de instabilidade de microssatélites entre 109 casos com NEC²¹. A revisão sistemática previamente citada encontrou 10% de instabilidade de microssatélite, embora tenha avaliado essencialmente NEC gástricos e colorretais sem distingui-los entre TNE G3 e NEC¹⁸. Instabilidade de microssatélites têm sido reportada em casos anedóticos e, frequentemente, se desconhecem se são casos de TNE G3 ou de NEC. Apesar de sua baixa frequência, é importante investigar a presença de instabilidade de microssatélites em casos de NEC, por ser um marcador preditivo de resposta aos bloqueadores de correceptores imunes. Instabilidade de microssatélites pode ser facilmente rastreado por imunohistoquímica pela expressão de proteínas dos genes de reparo de DNA (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) no tecido tumoral.

A eficácia do uso de bloqueadores de correceptores imunes está associada à presença de biomarcadores preditivos, entre eles a expressão de PD-L1. Comparativamente aos TNE G1-2, os NEC apresentam um microambiente imune tumoral quente, com mais linfócitos infiltrativo tumorais e maior expressão de PD-L1^{55, 56}. Embora esses sejam fatores preditores de benefício à imunoterapia, evidências recentes com estudos de fase I e fase 2, evidenciam que este benefício é discreto (Tabela 5).

Tabela 6 – Terapia com bloqueadores dos correceptores imunes em NEN G3

Autor (Ref.)	Tipo de estudo	Histologia (n)	Regime	Taxa de resposta	SLP (meses)	SG (meses)
Mehnert ⁵⁷	Fase 1	TNE (25); pTNE (16)	Pembrolizumabe	12% (TNE) 6% (pNET)	5,6 (TNE) 4,5 (pTNE)	21 (TNE) 21 (pTNE)
Vijayvergia ⁵⁸	Fase 2	NEN G3 (29)	Pembrolizumabe	RP 3% DE 21%	2	5
Patel ⁵⁹	Fase 2	NEN G3 (18) Não-G3 (14)	Nivolumabe/ Ipilimumabe	44% (NEN G3) 0% (Não-G3)	4	11

Nota 1: Mehnert, et al: apenas tumores PD-L1 positivos, classificando-os em “carcinoides” sem diferenciação do grau.

Nota 2: Vijayvergia et al: análise conjunta de 2 estudos prospectivos não randomizados.

Nota 3: Patel et al: reportada a coorte não pancreática.

Abreviações: DE, doença estável; n, número de pacientes; NA, não alcançada; NEN, neoplasias neuroendócrinas; pTNE, tumor neuroendócrino pancreático; Ref., referência; RP, resposta parcial; SG, sobrevida global; SLP, sobrevida livre de progressão; TNE G3, tumor neuroendócrino grau 3.

Após a revisão patológica, obtivemos uma alteração no diagnóstico em quase um quarto dos casos, em linha com um grande estudo do grupo nórdico que encontrou 12% de NET G3 entre 196 NEN G3⁵². A identificação de TNE G3 é importante por abrir uma janela de oportunidades terapêuticas. TNE G3 usualmente compartilha de alterações genômicas (via *PIK3/mTOR* e em *DAXX/ATRX*, *PTEN*, *TSC2*, entre outras) com os TNE G1-2 do mesmo local anatômico (Tabela 6)^{60, 61}.

Ao longo dos anos, dado a prévia classificação WHO 2010, os pacientes com TNE G3 foram tratados à semelhança dos pacientes com NEC. Estudos retrospectivos mostraram que os TNE G3 são menos sensíveis à quimioterapia baseada em platina que os NEC, exemplificado pela baixa taxa de resposta das NEN G3 com baixo Ki-67 à platina no estudo nórdico^{26, 62}. Provavelmente isso deve-se ao fato que o prognóstico dos TNE G3 é mais relacionado à morfologia bem diferenciada do tumor do que ao valor do Ki-67, os aproximando mais dos TNE G2 dos que dos NEC. Todavia, têm sido relatadas respostas de TNE G3 à combinação de fluoropirimidinas com oxaliplatina⁶³⁻⁶⁶.

Evidência crescente sugere que terapias para TNE G1-2 também podem ser utilizadas para os TNE G3, principalmente para os com Ki-67 < 50%. Séries retrospectivas reportaram sobrevida livre de progressão de 6 meses com everolimus⁶⁷, 16 meses com terapia com radionuclídeo⁶⁸, e 9 meses com capecitabina e temozolomida⁶⁹ (Tabela 6). Embora raros, os pacientes com TNE G3 com Ki-67 maior que 55% devem ser avaliados considerando o comportamento e volume tumoral, e nesses casos, um tratamento com platina e etoposídeo ou irinotecano pode ser considerado.

Tabela 7 – Tratamento do TNE G3

Autor (Ref.)	Tipo de estudo	Histologia (n)	Regime	Taxa de resposta	SLP (meses)	SG (meses)
Chan ⁷⁰	Retrospectivo	TNE G3 (64)	CAPTEM	36%	6	32
Sahu ⁷¹	Retrospectivo	TNE G3 (11)	CAPTEM	47%	5	19
Thomas ⁷²	Retrospectivo	NEN G3 (32)	CAPTEM	12%	7	33
Spada ⁶³	Retrospectivo	TNE G3 (10)	Baseada em OHP	26%	9	15
Pellat ⁷³	Retrospectivo	TNE G3 (6)	Sunitinibe	33%	2	5
Okuyama ⁷⁴	Fase 2	pNEN G3 (25)	Everolimo	0%	1	8
Panzuto ⁶⁷	Retrospectivo	pNEC (15)	Everolimo	-	6	28

Nota 1: Spada, et al: quimioterapia baseada em oxaliplatina incluiu CAPOX (capecitabina e oxaliplatina), GEMOX (gencitabina e oxaliplatina) e FOLFOX (fluorouracil e oxaliplatina).

Abreviações: CAPTEM, capecitabina e temozolomida; DE, doença estável; n, número de pacientes; NA, não alcançada; NEN, neoplasias neuroendócrinas; OHP, oxaliplatina; pNEC, carcinoma neuroendócrino pancreático; pTNE, tumor neuroendócrino pancreático; RP, resposta parcial; SG, sobrevida global; SLP, sobrevida livre de progressão; TNE G3, tumor neuroendócrino grau 3.

A utilidade de um painel NGS para investigar alterações moleculares acionáveis em NEN G3 permanece para ser determinada. No estudo Master, onde 108 pacientes com NEN (9 com TNE G3 e 49 com NEC) foram submetidos a uma avaliação molecular tumoral e investigou-se a utilidade da terapia alvo guiada pelos resultados do NGS⁷⁵. Entre os pacientes tratados com terapia direcionada e disponíveis para avaliação de resposta (12 de 91 com recomendações para tais tratamentos), um paciente com TNE G3 e instabilidade de microssatélites recebeu tratamento com bloqueador de correceptor imune e apresentou doença estável por apenas alguns meses, um paciente com TNE G3 gastrointestinal e fusão de *ALK* recebeu crizotinib e apresentou progressão de doença em sua primeira avaliação, e dois pacientes (1 com TNE G3 e outro com NEC) ambos com mutação em *PALB2*, receberam olaparibe monoterapia e apresentaram progressão de doença como melhor resposta. Em nosso estudo, exceto pelos 14% de pacientes com NEC, nenhuma outra alteração molecular com potencial de guiar a terapêutica foi encontrada. Em contrapartida, relatos de casos sugeriram um benefício clínico com o uso de inibidores de *BRAF* para NEC colorretais e mutações em *BRAF*^{V600E}⁷⁶. Dado a raridade das alterações moleculares encontradas em NEN G3 e os resultados preliminares frustrados, o uso de painéis de NGS para guiar o tratamento dos TNE G3 deve ser reservado ao contexto de pesquisa clínica.

As limitações deste estudo incluem o seu desenho retrospectivo. Consequentemente, ausência de dados acurados em relação à taxa de resposta e sobrevidas livres de progressão. O inerente viés de seleção pode ter sido minimizado pela identificação consecutiva de

pacientes do nosso banco de dados. Outra limitação foi o pequeno número de pacientes com amostras tumorais consideradas apropriadas para a realização de NGS (escassez de tumor coletado por biópsias no contexto de doença avançada inoperável). No entanto, a raridade das NEN G3 torna desafiador a realização de um estudo prospectivo. Aspectos positivos incluem a realização de revisão patológica uma patologista especialista em NEN, dados moleculares de NEN G3 da América Latina e informação sobre a carga mutacional e perfil molecular no raro subgrupo de TNE G3.

Esforços colaborativos são a chave para avançar o campo de pesquisa em neoplasias raras como as NEN G3. Parte dos dados deste estudo, por exemplo, foram associados aos de três centros europeus para investigar a importância clínica da diferenciação histológica dos NEC em pequenas e grandes células²³. Nesse contexto, colaborações entre instituições (e países) para coletar e armazenar amostras biológicas de pacientes com NEN G3, como tecidos tumorais, amostras de sangue para biomarcadores imunes, DNA circulante tumoral e amostras para estudo de microbioma fecal/tumoral, podem ser úteis para investigar os mecanismos envolvidos na carcinogênese e progressão dessas neoplasias.

7 CONCLUSÃO

A revisão patológica com foco na distinção entre morfológica é primordial para reclassificar as NEN G3 em TNE G3 ou NEC, com distintos comportamentos clínicos e perfis moleculares. Especialmente para os TNE G3 a correta classificação possui implicações terapêuticas porque muitos destes pacientes podem ser tratados como pacientes com TNE G2. O perfil molecular das NEN G3 mostra, no geral, uma baixa carga mutacional e poucas alterações acionáveis. Atualmente, o uso de NGS para guiar a terapia dos NET G3 é limitado. No entanto, consideramos que a instabilidade de microssatélites deve ser procurada em pacientes com NEC por poderem serem beneficiados com a terapia com bloqueadores dos correceptores imunes.

8 REFERÊNCIAS

1. Riechelmann RP, Weschenfelder RF, Costa FP, Andrade AC, Osvaldt AB, Quidute ARP. Guidelines for the management of neuroendocrine tumours by the Brazilian gastrointestinal tumour group. *Ecantermedicalscience*. 2017;11(716).
2. Klöppel G. Oberndorfer and His Successors: From Carcinoid to Neuroendocrine Carcinoma. *Endocr Pathol*. 2007;18(3):141-4.
3. Garcia-Carbonero R, Sorbye H, Baudin E, Raymond E, Wiedenmann B, Niederle B, et al. ENETS Consensus Guidelines for High-Grade Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors and Neuroendocrine Carcinomas. *Neuroendocrinology*. 2016;103(2):186-94.
4. Sahani DV, Bonaffini PA, Fernandez-Del Castillo C, Blake MA. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: role of imaging in diagnosis and management. *Radiology*. 2013;266(1):38-61.
5. Dasari A, Shen C, Halperin D, Zhao B, Zhou S, Xu Y, et al. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol*. 2017;3(10):1335-42.
6. Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE. One Hundred Years After "Carcinoid": Epidemiology of and Prognostic Factors for Neuroendocrine Tumors in 35,825 Cases in the United States. *J Clin Oncol*. 2008;26(18):3063-72.
7. Rêgo JFdM, Medeiros RSSd, Braghiroli MI, Galvão B, Neto JEB, Munhoz RR. Expression of ERCC1, Bcl-2, Lin28a, and Ki-67 as biomarkers of response to first-line platinum-based chemotherapy in patients with high-grade extrapulmonary neuroendocrine carcinomas or small cell lung cancer. *Ecantermedicalscience*. 2017;11(767).
8. Creutzfeldt W. Carcinoid tumors: development of our knowledge. *World J Surg*. 1996;20(2):126-31.
9. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983;31(1):13-20.
10. Böhm J, Koch S, Gais P, Jutting U, Prauer HW, Hofler H. Prognostic value of MIB-1 in neuroendocrine tumours of the lung. *J Pathol*. 1996;178(4):402-9.
11. Pelosi G, Zamboni G. Proliferation Markers and Their Uses in the Study of Endocrine Tumors. *Endocr Pathol*. 1996;7(2):103-19.
12. Solcia E, Klöppel G, Sobin LH. Histological typing of endocrine tumours. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2000.
13. Rindi G, Kloppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, et al. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch*. 2006;449(4):395-401.
14. Lloyd RV, Osamura RY, Klöppel G, Rosai J. WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research in Cancer (IARC); 2010.
15. WHO Classification of Tumours. Digestive System Tumours. 5th ed. Lyon, France: International Agency for Research in Cancer (IARC); 2019.
16. Velayoudom-Cephise FL, Duvillard P, Foucan L, Hadoux J, Chougnet CN, Leboulleux S, et al. Are G3 ENETS neuroendocrine neoplasms heterogeneous? *Endocr Relat Cancer*. 2013;20(5):649-57.

17. Rindi G, Klimstra DS, Abedi-Ardekani B, Asa SL, Bosman FT, Brambilla E, et al. A common classification framework for neuroendocrine neoplasms: an International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO) expert consensus proposal. *Mod Pathol*. 2018;31(12):1770-86.
18. Girardi DM, Silva ACB, Rego JFM, Coudry RA, Riechelmann RP. Unraveling molecular pathways of poorly differentiated neuroendocrine carcinomas of the gastroenteropancreatic system: A systematic review. *Cancer Treat Rev*. 2017;56:28-35.
19. Tang LH, Untch BR, Reidy DL, O'Reilly E, Dhall D, Jih L, et al. Well-Differentiated Neuroendocrine Tumors with a Morphologically Apparent High-Grade Component: A Pathway Distinct from Poorly Differentiated Neuroendocrine Carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2016;22(4):1011-7.
20. Melchior L, Willemoe G, Garbyal R, Langer S, Knigge U, Federspiel B. Next Generation Sequencing of 294 Neuroendocrine G3 and Mixed Neuroendocrine and Non-Neuroendocrine Neoplasms Identifies Molecular Profile Linked to the Site of the Primary and Tumor Composition. *Neuroendocrinology*. 2019;108(suppl 1).
21. Venizelos A, Elvebakken H, Perren A, Hjortland GO, Sundlov A, Svensson JB, et al. Mutational landscape of 109 High-Grade Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms G3. *Neuroendocrinology*. 2020;110(suppl 1):53.
22. Zandee WT, Kamp K, van Adrichem RC, Feelders RA, de Herder WW. Effect of hormone secretory syndromes on neuroendocrine tumor prognosis. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(7):R261-R74.
23. Frizziero M, Durand A, Taboada RG, Zaninotto E, Luchini C, Chakrabarty B, et al. Is the Morphological Subtype of Extra-Pulmonary Neuroendocrine Carcinoma Clinically Relevant? *Cancers (Basel)*. 2021;13(16).
24. Oberg K, Modlin IM, Herder WD, Pavel M, Klimstra D, Frilling A. Consensus on biomarkers for neuroendocrine tumour disease. *Lancet Oncol*. 2015;16(9):435-46.
25. Dasari A, Mehta K, Byers LA, Sorbye H, Yao JC. Comparative study of lung and extrapulmonary poorly differentiated neuroendocrine carcinomas: A SEER database analysis of 162,983 cases. *Cancer*. 2018;124(4):807-15.
26. Sorbye H, Welin S, Langer SW, Vestermark LW, Holt N, Osterlund P, et al. Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study. *Ann Oncol*. 2013;24(1):152-60.
27. Moertel CG, Kvols LK, O'Connell MJ, Rubin J. Treatment of neuroendocrine carcinomas with combined etoposide and cisplatin. Evidence of major therapeutic activity in the anaplastic variants of these neoplasms. *Cancer*. 1991;68(2):227-32.
28. Mitry E, Baudin E, Ducreux M, Sabourin JC, Rufie P, Aparicio T, et al. Treatment of poorly differentiated neuroendocrine tumours with etoposide and cisplatin. *Br J Cancer*. 1999;81(8):1351-5.
29. Pavel M, Oberg K, Falconi M, Krenning EP, Sundin A, Perren A, et al. Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2020;31(7):844-60.
30. Moertel CG, Kvols LK, O'Connell MJ, Rubin J. Treatment of Neuroendocrine Carcinomas With Combined Etoposide and Cisplatin Evidence of major therapeutic activity in the anaplastic variants of these neoplasms. *Cancer*. 1991;68(2):227-32.

31. Mitry E, Baudin E, Ducreux M, Sabourin J-C, Rufié P, Aparicio T, et al. Treatment of poorly differentiated neuroendocrine tumours with etoposide and cisplatin. *Br J Cancer*. 1999;81(8):1351-5.
32. Kulke MH, Wu B, Ryan DP, Enzinger PC, Zhu AX, Clark JW. A phase II trial of irinotecan and cisplatin in patients with metastatic neuroendocrine tumors. *Dig Dis Sci*. 2006;51(6):1033-8.
33. Munhoz RR, Rego JFdM, Ferrari ARdC, Braghiroli MI, Bariani GM, Hoff PM. Combination of irinotecan and a platinum agent for poorly differentiated neuroendocrine carcinomas. *Rare Tumors*. 2013;5(3):135-9.
34. Sorbye H, Welin S, Langer SW, Vestermark LW, Holt N, Osterlund P, et al. Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): The NORDIC NEC study. *Ann Oncol*. 2013;24:152-60.
35. Girardi DM, Silva ACB, Rêgo JFM, Coudry RA, Riechelmann RP. Unraveling molecular pathways of poorly differentiated neuroendocrine carcinomas of the gastroenteropancreatic system: A systematic review. *Cancer Treat Rev*. 2017;56:28-35.
36. Bergsland EK, Roy R, Stephens P, Ross JS, Bailey M, Olshen A. Genomic profiling to distinguish poorly differentiated neuroendocrine carcinomas arising in different sites. *J Clin Oncol*. 2016;34(15_suppl):4020.
37. Hamburg MA, Collins FS. The path to personalized medicine. *N Engl J Med*. 2010;363(4):301-4.
38. Garraway LA. Genomics-driven oncology: framework for an emerging paradigm. *J Clin Oncol*. 2013;31(15):1806-14.
39. Tourneau CL, Paoletti X, Servant N, Bièche I, Gentien D, Frio TR. Randomised proof-of-concept phase II trial comparing targeted therapy based on tumour molecular profiling vs conventional therapy in patients with refractory cancer: results of the feasibility part of the SHIVA trial. *Br J Cancer*. 2014;111(1):17-24.
40. Goodman AM, Kato S, Bazhenova L, Patel SP, Frampton GM, Miller V. Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(11):2598-608.
41. Abul-Husn NS, Kenny EE. Personalized Medicine and the Power of Electronic Health Records. *Cell*. 2019;177(1):58-69.
42. Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, et al. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science*. 2011;331(6021):1199-203.
43. Scarpa A, Chang DK, Nones K, Corbo V, Patch AM, Bailey P, et al. Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours. *Nature*. 2017;543(7643):65-71.
44. Kidd M, Modlin I, Oberg K. Towards a new classification of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(11):691-705.
45. Sharma P, Siddiqui BA, Anandhan S, Yadav SS, Subudhi SK, Gao J, et al. The Next Decade of Immune Checkpoint Therapy. *Cancer Discov*. 2021;11(4):838-57.
46. FDA Summary of Safety and effectiveness Data (SSED). FoundationOne CDx. [Available from: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf17/P170019B.pdf.
47. Merino DM, McShane LM, Fabrizio D, Funari V, Chen SJ, White JR, et al. Establishing guidelines to harmonize tumor mutational burden (TMB): in silico assessment of variation in TMB quantification across diagnostic platforms: phase I of the Friends of Cancer Research TMB Harmonization Project. *J Immunother Cancer*. 2020;8(1).

48. Lamer A, Laurent G, Pelayo S, El Amrani M, Chazard E, Marcilly R. Exploring Patient Path Through Sankey Diagram: A Proof of Concept. *Stud Health Technol Inform.* 2020;270:218-22.
49. Milione M, Maisonneuve P, Spada F, Pellegrinelli A, Spaggiari P, Albarello L, et al. The Clinicopathologic Heterogeneity of Grade 3 Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms: Morphological Differentiation and Proliferation Identify Different Prognostic Categories. *Neuroendocrinology.* 2016;104(1):85-93.
50. Basturk O, Yang Z, Tang LH, Hruban RH, Adsay V, McCall CM, et al. The high-grade (WHO G3) pancreatic neuroendocrine tumor category is morphologically and biologically heterogenous and includes both well differentiated and poorly differentiated neoplasms. *Am J Surg Pathol.* 2015;39(5):683-90.
51. Heetfeld M, Chougnet CN, Olsen IH, Rinke A, Borbath I, Crespo G, et al. Characteristics and treatment of patients with G3 gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr Relat Cancer.* 2015;22(4):657-64.
52. Elvebakken H, Perren A, Scoazec J-Y, Tang LH, Federspiel B, Klimstra DS, et al. A consensus developed morphological re-evaluation of 196 high-grade gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms and its clinical correlations. *Neuroendocrinology.* 2020.
53. Raj N, Valentino E, Capanu M, Tang LH, Basturk O, Untch BR, et al. Treatment Response and Outcomes of Grade 3 Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms Based on Morphology: Well Differentiated Versus Poorly Differentiated. *Pancreas.* 2017;46(3):296-301.
54. Vijayvergia N, Boland PM, Handorf E, Gustafson KS, Gong Y, Cooper HS, et al. Molecular profiling of neuroendocrine malignancies to identify prognostic and therapeutic markers: a Fox Chase Cancer Center Pilot Study. *Br J Cancer.* 2016;115(5):564-70.
55. Milione M, Miceli R, Barretta F, Pellegrinelli A, Spaggiari P, Tagliabue G, et al. Microenvironment and tumor inflammatory features improve prognostic prediction in gastro-entero-pancreatic neuroendocrine neoplasms. *J Pathol Clin Res.* 2019;5(4):217-26.
56. Ferrata M, Schad A, Zimmer S, Musholt TJ, Bahr K, Kuenzel J, et al. PD-L1 Expression and Immune Cell Infiltration in Gastroenteropancreatic (GEP) and Non-GEP Neuroendocrine Neoplasms With High Proliferative Activity. *Front Oncol.* 2019;9:343.
57. Mehnert JM, Bergsland E, O'Neil BH, Santoro A, Schellens JHM, Cohen RB, et al. Pembrolizumab for the treatment of programmed death-ligand 1-positive advanced carcinoid or pancreatic neuroendocrine tumors: Results from the KEYNOTE-028 study. *Cancer.* 2020;126(13):3021-30.
58. Vijayvergia N, Dasari A, Deng M, Litwin S, Al-Toubah T, Alpaugh RK, et al. Pembrolizumab monotherapy in patients with previously treated metastatic high-grade neuroendocrine neoplasms: joint analysis of two prospective, non-randomised trials. *Br J Cancer.* 2020;122(9):1309-14.
59. Patel SP, Othus M, Chae YK, Giles FJ, Hansel DE, Singh PP, et al. A Phase II Basket Trial of Dual Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Blockade in Rare Tumors (DART SWOG 1609) in Patients with Nonpancreatic Neuroendocrine Tumors. *Clin Cancer Res.* 2020;26(10):2290-6.
60. Puccini A, Poorman K, Salem ME, Soldato D, Seeber A, Goldberg RM, et al. Comprehensive Genomic Profiling of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms (GEP-NENs). *Clin Cancer Res.* 2020;26(22):5943-51.
61. Mafficini A, Scarpa A. Genetics and Epigenetics of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms. *Endocr Rev.* 2019;40(2):506-36.
62. Fazio N, Milione M. Heterogeneity of grade 3 gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinomas: New insights and treatment implications. *Cancer Treat Rev.* 2016;50:61-7.

63. Spada F, Antonuzzo L, Marconcini R, Radice D, Antonuzzo A, Ricci S, et al. Oxaliplatin-Based Chemotherapy in Advanced Neuroendocrine Tumors: Clinical Outcomes and Preliminary Correlation with Biological Factors. *Neuroendocrinology*. 2016;103(6):806-14.
64. Bajetta E, Catena L, Procopio G, De Dosso S, Bichisao E, Ferrari L, et al. Are capecitabine and oxaliplatin (XELOX) suitable treatments for progressing low-grade and high-grade neuroendocrine tumours? *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007;59(5):637-42.
65. Bajetta E, Catena L, Biondani P, Pusceddu S, Valente M, Bianco N, et al. Activity of a three-drug combination including cisplatin (CLOVER regimen) for poorly differentiated neuroendocrine carcinoma. *Anticancer Res*. 2014;34(10):5657-60.
66. Kunz PL, Balise RR, Fehrenbacher L, Pan M, Venook AP, Fisher GA, et al. Oxaliplatin-Fluoropyrimidine Chemotherapy Plus Bevacizumab in Advanced Neuroendocrine Tumors: An Analysis of 2 Phase II Trials. *Pancreas*. 2016;45(10):1394-400.
67. Panzuto F, Rinzivillo M, Spada F, Antonuzzo L, Ibrahim T, Campana D, et al. Everolimus in Pancreatic Neuroendocrine Carcinomas G3. *Pancreas*. 2017;46(3):302-5.
68. Carlsen EA, Fazio N, Granberg D, Grozinsky-Glasberg S, Ahmadzadehfar H, Grana CM, et al. Peptide receptor radionuclide therapy in gastroenteropancreatic NEN G3: a multicenter cohort study. *Endocr Relat Cancer*. 2019;26(2):227-39.
69. Liu AJ, Ueberroth BE, McGarrah PW, Buckner Petty SA, Kendi AT, Starr J, et al. Treatment Outcomes of Well-Differentiated High-Grade Neuroendocrine Tumors. *Oncologist*. 2021;26(5):383-8.
70. Chan DL, Bergsland EK, Chan JA, Gadgil R, Halfdanarson TR, Hornbacker K, et al. Temozolomide in Grade 3 Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms: A Multicenter Retrospective Review. *Oncologist*. 2021.
71. Sahu A, Jefford M, Lai-Kwon J, Thai A, Hicks RJ, Michael M. CAPTEM in Metastatic Well-Differentiated Intermediate to High Grade Neuroendocrine Tumors: A Single Centre Experience. *J Oncol*. 2019;2019:9032753.
72. Thomas K, Voros BA, Meadows-Taylor M, Smeltzer MP, Griffin R, Boudreaux JP, et al. Outcomes of Capecitabine and Temozolomide (CAPTEM) in Advanced Neuroendocrine Neoplasms (NENs). *Cancers (Basel)*. 2020;12(1).
73. Pellat A, Dreyer C, Couffignal C, Walter T, Lombard-Bohas C, Niccoli P, et al. Clinical and Biomarker Evaluations of Sunitinib in Patients with Grade 3 Digestive Neuroendocrine Neoplasms. *Neuroendocrinology*. 2018;107(1):24-31.
74. Okuyama H, Ikeda M, Okusaka T, Furukawa M, Ohkawa S, Hosokawa A, et al. A Phase II Trial of Everolimus in Patients with Advanced Pancreatic Neuroendocrine Carcinoma Refractory or Intolerant to Platinum-Containing Chemotherapy (NECTOR Trial). *Neuroendocrinology*. 2020;110(11-12):988-93.
75. Kreutzfeldt S, Apostolidis L, Oles M, Horak P, Heilig CE, Heining C. Clinical relevance of comprehensive genomic analysis in patients with advanced-stage neuroendocrine neoplasms: Results from the MASTER trial of the German Cancer Consortium. *Cancer Res*. 2019;79(suppl 13):919.
76. Capdevila J, Arques O, Hernandez Mora JR, Matito J, Caratu G, Mancuso FM, et al. Epigenetic EGFR Gene Repression Confers Sensitivity to Therapeutic BRAFV600E Blockade in Colon Neuroendocrine Carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2020;26(4):902-9.

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**

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **27/11/2018**, aprovaram a realização do projeto nº. **2642/18** intitulado: “Características clínicas e moleculares dos tumores neuroendócrinos gastrointestinais de grau 3: epidemiologia e fatores prognósticos.”

Pesquisador Responsável: Rachel Simões Pimenta Riechelmann
Aluno: Rodrigo Gomes Taboada (Mestrado)

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

São Paulo, 07 de dezembro de 2018.

Atenciosamente,

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

Anexo 2 – Comprovante da submissão do artigo científico

Journal of Neuroendocrinology

**Clinicopathological and Molecular Profile of Grade 3
Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms**

Journal:	<i>Journal of Neuroendocrinology</i>
Manuscript ID	JNE-21-0190-OA
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	30-Sep-2021
Complete List of Authors:	Taboada, Rodrigo; ACCamargo Cancer Center, Medical Oncology Claro, Laura; ACCamargo Cancer Center, Pathology Felismino, Tiago; ACCamargo Cancer Center, Medical Oncology de Jesus, Victor Hugo; ACCamargo Cancer Center, Medical Oncology Barros, Milton; ACCamargo Cancer Center, Medical Oncology Riechermann, Rachel; ACCamargo Cancer Center, Department of Clinical Oncology
Keywords:	high-grade neuroendocrine neoplasms; neuroendocrine carcinoma; grade 3 neuroendocrine tumor; molecular landscape

SCHOLARONE™
Manuscripts