



**A.C. Camargo Cancer Center**

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

**IMPACTO DO STATUS DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DE  
EPSTEIN-BARR E DO PERFIL DE INSTABILIDADE DE  
MICROSSATÉLITES NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES  
PORTADORES DE ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS**

**LUANA BATISTA DO CARMO DOS SANTOS**

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Emmanuel Dias-Neto  
Co-orientadora: Dra. Thais Bartelli

São Paulo

2023

**SANTOS, LUANA BATISTA DO CARMO DOS.**

**IMPACTO DO STATUS DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DE EPSTEIN-BARR E DO PERFIL DE INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES PORTADORES DE ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS. / LUANA BATISTA DO CARMO DOS SANTOS. São Paulo, 2023.**

**104f.**

**Dissertação de Mestrado - Fundação Antônio Prudente.  
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:  
Oncologia.**

**Orientador: Dr. Emmanuel Dias-Neto.**

**1. Adenocarcinoma Gástrico (AdG), 2. Vírus de Epstein-Barr (EBV) , 3. Instabilidade de microssatélites de DNA (MSI)**

**CDU 616**

## **SUPORTE A PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO**

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo Projeto Temático 2014/26897-0, além de suporte financeiro do PRONON/DECIT 25000.055.167/2015-23.

**Título:** Impacto do status da infecção pelo vírus de Epstein-Barr e do perfil de instabilidade de microssatélites no prognóstico de pacientes portadores de adenocarcinomas gástricos.

**Aprovado em: 18/01/2023**

### **BANCA EXAMINADORA**

Orientador: Dr. Emmanuel Dias-Neto.

Instituição: Fundação Antônio Prudente.

Membro da banca: Dra. Giovana Tardin Torrezan.

Instituição: Fundação Antônio Prudente.

Membro da banca: Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima.

Instituição: Fundação Antônio Prudente.

Membro da banca: Dr. Marcus F. Kodama P. Ramos.

Instituição: Universidade de São Paulo (USP).

Membro suplente: Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano.

Instituição: Universidade Federal do Pará.

Dedico este trabalho a minha família, que esteve ao meu lado em todos os desafios e compreendeu a minha ausência durante o tempo necessário.

***“O tamanho dos seus sonhos deve sempre exceder a sua capacidade de alcançá-los. Se os seus sonhos não te assustam, eles não são grandes o suficiente”.***

*Ellen Johnson-Sirleaf, Nobel da Paz em 2011 .*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos e desafios vividos e vencidos até aqui.

Aos meus pais, Vera e Augusto, cujos suporte e incentivo à minha educação foram essenciais durante toda minha vida. Nesse período em que estive longe da minha família, em busca do mestrado e de crescimento profissional, eles permaneceram me dando amor e força para seguir em frente.

Ao meu noivo, Matheus, que é o meu incentivador, me deu apoio incondicional em diversas etapas da minha vida pessoal e profissional.

Aos meus orientadores, Dr. Emmanuel Dias-Neto e Dra. Thais Bartelli, que me guiaram neste desafio e me ensinaram a vencer as dificuldades do caminho. E também a Dra. Diana Noronha, pelas suas contribuições.

A toda equipe do Laboratório de Genômica Médica do A.C.Camargo, os colegas de trabalho como técnica de pesquisa e aluna, pelo aprendizado técnico-científico e desenvolvimento profissional.

Ao grupo de Bioinformática e Biologia Computacional do A.C.Camargo, liderado pelo Dr. Israel Tojal, por todo suporte científico, auxílio nas análises e discussões engrandecedoras.

Ao pesquisador Dr. Rodrigo Drummond, do grupo de bioinformática, que contribuiu à construção do meu aprendizado e dos resultados deste trabalho, pela paciência para me ensinar e dedicação.

Ao Dr. Alexandre Defelicibus e ao Renan Valieris, do grupo de bioinformática, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

A Dra. Jaqueline Ramalho, ex-aluna do grupo de bioinformática, que mesmo fora da Instituição dedicou seu tempo a me ajudar e ensinar.

Aos médicos e enfermeiros de pesquisa do corpo clínico do A.C.Camargo, especialmente ao Dr. Felipe Coimbra e Dra Adriane Pelosof, que são parte essencial do desenvolvimento deste trabalho.

A equipe do laboratório de histologia e patologistas do A.C.Camargo, que contribuíram para os resultados anatomopatológicos do trabalho.

A equipe do escritório de projetos do A.C.Camargo, que dá suporte essencial à Instituição e ao desenvolvimento dos trabalhos de todos.

A minha amiga Sandra, que dividiu sua jornada da pós-graduação e início da vida profissional comigo, mesmo que a distância.

A minha amiga Paula, que se tornou um presente e foi uma pessoa muito importante durante minha estada em São Paulo.

Aos amigos que ganhei no CIPE, como a Ester e Kátia, que me deram suporte pessoal e profissional nesse tempo e manterei a amizade.

Aos alunos do laboratório, pela amizade e por me permitirem compartilhar conhecimento, pois aprendi ainda mais ao ensiná-los.

## RESUMO

Santos, L. B. C. **Impacto do status da infecção pelo vírus de Epstein-Barr e do perfil de instabilidade de microssatélites no prognóstico de pacientes portadores de adenocarcinomas gástricos.** [Dissertação] São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2023.

A determinação acurada do prognóstico tumoral ainda é um desafio no tratamento oncológico. Estudos sugerem que dois dos subtipos moleculares de adenocarcinomas gástricos (AdGs), talvez tenham melhor prognóstico quando comparados aos demais: aqueles caracterizados pela presença do vírus Epstein-Barr (AdG-EBV) e aqueles com instabilidade de microssatélites de DNA (AdG-MSI). No Brasil, a distribuição destes subtipos ainda não foi profundamente investigada, e não sabemos o impacto prognóstico dos mesmos na nossa população, que possui aspectos étnicos e epidemiológicos próprios. O objetivo deste trabalho é determinar a prevalência e a relevância clínica/prognóstica dos subtipos EBV e MSI, em uma coorte de pacientes portadores de AdG tratados no A.C.Camargo Cancer Center. A coorte incluiu 198 pacientes diagnosticados entre 2016 a 2020, dos quais foram coletadas amostras de biópsias tumorais (195/198) e fluidos gástricos (167/198). A presença do DNA de EBV foi avaliada por qPCR e o status de MSI foi determinado a partir de dados de sequenciamento de exoma das amostras tumorais (MSIseq/NGS classifier). Na avaliação prognóstica utilizamos análise de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier e Log Rank (R v. 4.1.2). Para as análises estatísticas utilizamos principalmente os testes de qui-quadrado e exato de Fisher na análise de fatores clínicos (SPSS v. 25). A prevalência observada na coorte para EBV+ e MSI+ foi exatamente a mesma: 7,1% (14/198 casos), similar a outros relatos da literatura. A média de idade para pacientes EBV+ e EBV- foi similar (respectivamente, 60 e 61,7 anos), e o sexo predominante para os dois grupos foi o masculino (85,7% para EBV+ e 60,3% para EBV-). Quanto aos casos MSI+, a média de idade foi de 74,3 anos e maioria do sexo feminino (71,4%,  $p=0,016$ ), enquanto os pacientes MSI- tiveram média de 60,6 anos e o sexo masculino prevalente (64,7%). A distribuição dos casos EBV+ e MSI+ quanto aos subtipos de Lauren, foi respectivamente,

28,6% e 69,2% para intestinal, 57,1% e 15,4% para difuso, e 14,3% e 15,4 % para o subtipo misto. Observamos relação significativa entre esta classificação e o status MSI ( $p=0,017$ ), mas não para a presença de EBV. O impacto prognóstico foi avaliado pela sobrevida câncer específica (CE) e sobrevida livre de recidiva em 05 anos nas condições: (A) excluindo os casos metastáticos ao diagnóstico e (B) excluindo também os com estadiamento TNM IV. Não observamos diferenças estatísticas entre os grupos, o que talvez seja fruto de uma casuística ainda limitada frente à baixa frequência de EBV e MSI em nossa população. Entretanto, os casos EBV+ não apresentaram recidiva da doença, sugerindo um impacto positivo da presença de EBV. Além disso, avaliamos a relação entre a ancestralidade genômica e os AdGs EBV e MSI, onde a ancestralidade predominante principal foi a europeia, seguida da asiática, mas não observamos efeito da ancestralidade quanto ao prognóstico dos subtipos. Ademais, avaliamos a carga mutacional tumoral (CMT) e as assinaturas mutacionais onde se destacou a associação com o status MSI+, grupo no qual foram identificadas as assinaturas correspondentes à deficiência em MMR e idade mais avançada. Os pacientes MSI+ tinham idade mais elevada, o que pode ter afetado o prognóstico inicial. Entretanto, os casos MSI+ com CMT alta se distinguem do resultado da coorte total e apresentaram o prognóstico mais favorável. Dessa forma pudemos aprofundar a compreensão dos AdGs EBV e MSI, contribuir para o detalhamento molecular desta população no Brasil.

Palavras-chave: Adenocarcinoma Gástrico (AdG), Vírus de Epstein-Barr (EBV) e Instabilidade de microssatélites de DNA (MSI).

## ABSTRACT

Santos, L. B. C. [**Impact of Epstein-Barr virus infection status and microsatellite instability profile on the prognosis of patients with gastric adenocarcinomas**]. [Dissertação] São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2023.

The accurate determination of tumor prognosis still challenges cancer treatment. Studies have suggested that two of the molecular subtypes of gastric adenocarcinomas (GaCs) may have a better prognosis when compared to the others: those characterized by the presence of the Epstein-Barr virus (GaC-EBV) and those with DNA microsatellite instability (GaC-MSI). In Brazil, the distribution of these subtypes has not been thoroughly investigated, and we do not know their prognostic impact on our population, which has its own ethnic and epidemiological aspects. This study aims to determine the prevalence and clinical/prognostic relevance of the EBV and MSI subtypes in a cohort of patients with GaC treated at the A.C. Camargo Cancer Center. The cohort includes 198 patients recruited between 2016 and 2020, from whom tumor biopsies (195/198) and gastric fluid samples (167/198) were collected. The presence of EBV DNA was assessed by qPCR and MSI status was determined from exome sequencing data from tumor samples (MSIseq/NGS classifier). In the prognostic evaluation, we used survival analysis by the Kaplan-Meier and Log Rank method (R v. 4.1.2). For statistical analyses, we used Chi-square and Fisher's exact tests (SPSS v. 25). The prevalence observed in the cohort for EBV+ and MSI+ was the same: 7.1% (14/198 cases), similar to other reports in the literature. The mean age for EBV+ patients was 60 years and for EBV-, 61.7 years, and the predominant sex for both groups was male (85.7% for EBV+ and 60.3% for EBV-). As for the MSI+ cases, the mean age was 74.3 years and the majority were female (71.4%), while the MSI- patients had a mean age of 60.6 years and the male gender was prevalent (64.7%). The Lauren's subtypes distribution of EBV+ and MSI+ cases were respectively, 28.6 and 69.2% for intestinal, 57.1

and 15.4% for diffuse, and 14.3 and 15.4% for the subtype mixed. We observed a significant relationship between this classification and MSI status ( $p=0.017$ ), but not for the presence of EBV. The prognostic impact was assessed by overall survival and recurrence-free survival at 05 years in the following conditions: (A) excluding metastatic cases at diagnosis and (B) also excluding those with TNM stage IV. We did not observe statistical differences between the groups, which may be an effect of a limited cohort. However, EBV+ cases did not show disease recurrence, suggesting a preliminary positive impact of the presence of EBV in protecting against recurrences in GaC. In addition, we evaluated the relationship between genomic ancestry and the GaCs EBV and MSI, where the main predominant ancestry was European, followed by Asian. And we did not observe an effect of ancestry on the prognostic panorama of the subtypes. In addition, tumor mutation burden (TMB) and mutational signatures were evaluated to complement the molecular profile. There is an association highlighted for MSI+ status with the signatures corresponding to MMR deficiency and older age. This age factor was verified and the MSI+ patients were older, which affected the initial prognosis. However, MSI+ cases with high TMB differ from the result of the total cohort and presented the most favorable prognosis. In this way, we were able to deepen the understanding of GaCs EBV and MSI in order to contribute to their management in Brazil.

**Keywords:** Gastric Adenocarcinoma (GaC), Epstein-Bar Virus (EBV), and, DNA Microsatellite Instability (MSI).

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1. Câncer Gástrico.....	20
1.2. O vírus Epstein-Barr e o câncer gástrico.....	22
1.3. A instabilidade de microssatélites e o câncer gástrico.....	27
1.4. Ancestralidade genômica no AdG-EBV e AdG-MSI.....	31
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	34
2.1. Objetivo geral.....	34
2.2. Objetivos específicos.....	34
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	35
3.1. Casuística de estudo, coletas e processamento das amostras.....	35
3.2. Detecção de DNA viral de EBV nas amostras.....	37
3.3. Determinação do status de MSI e outras características do perfil molecular.....	37
3.4. Análises estatísticas.....	39
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
4.1. Prevalências dos subtipos AdG-EBV e AdG-MSI e características clínicas.....	41
4.2. Avaliação do impacto prognóstico da presença de EBV e MSI no AdG.....	49
4.3. Perfil molecular: MSI, ancestralidade genômica, CMT e assinaturas mutacionais.....	56
4.3.1 Ancestralidade genômica e prognóstico no AdG-EBV e AdG-MSI .....	56
4.3.2. CMT e assinaturas mutacionais no prognóstico do AdG-EBV e AdG-MSI .....	62
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	77
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	78

**LISTA DE SIGLAS**

<b>ACCCC</b>	A.C.Camargo Cancer Center
<b>ACRG</b>	<i>Asian Cancer Research Group</i>
<b>AdG</b>	Adenocarcinoma Gástrico
<b>AdG-EBV (CG EBV)</b>	Adenocarcinoma Gástrico com presença do vírus de Epstein-Barr
<b>AdG-MSI (CG MSI)</b>	Adenocarcinoma Gástrico com presença da instabilidade microsatélite
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BART</b>	<i>BamHI-A rightward transcripts</i>
<b>BHRF1</b>	BamHI fragment H rightward open reading frame 1
<b>bp</b>	<i>base pairs</i> (pares de bases de nucleotídeos)
<b>BWA-MEM</b>	<i>Burrows-Wheeler Aligner-Maximal Exact Match</i>
<b>CG</b>	Câncer Gástrico
<b>GS</b>	Subtipo de CG Genomicamente Estável
<b>IC</b>	Subtipo de CG com Instabilidade Cromossômica
<b>CE</b>	Sobrevida Câncer Específica
<b>CIMP</b>	<i>Non-random global CpG-island methylation phenotype</i>
<b>CMT</b>	Carga Mutacional Tumoral
<b>CMT/MB</b>	Carga Mutacional Tumoral normalizada por <i>Megabase</i>
<b>CNV</b>	<i>Copy Number Variation</i>
<b>CPS</b>	<i>Combined Positive Score</i>
<b>Cq</b>	Ciclo de quantificação na qPCR
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>EBER 1</b>	Epstein-Barr virus-encoded small RNA 1
<b>EBER 2</b>	Epstein-Barr virus-encoded small RNA 2

<b>EBERs</b>	miRNAs codificados por EBV
<b>EBNA-1</b>	EBV-determined nuclear antigen 1
<b>EBV</b>	Vírus de Epstein-Barr
<b>EBV-</b>	Ausência de DNA do vírus Epstein-Barr
<b>EBV+</b>	Presença de DNA do vírus Epstein-Barr
<b>Etnia auto-atrib.</b>	Abreviatura etnia autodeclarada pelo paciente
<b>EtOH</b>	Álcool etílico
<b>FAP</b>	Polipose Adenomatosa Familiar
<b>FDA</b>	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
<b>GATK4</b>	<i>Genome Analysis Toolkit 4</i>
<b>HDGC</b>	Câncer gástrico hereditário de tipo difuso
<b>HNPCC</b>	Síndrome Hereditária de Câncer de Cólon Não Polipoide
<b>Hp</b>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>HR</b>	<i>Hazard Ratio</i>
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>IC 95%</b>	Intervalo de Confiança de 95%
<b>ICESP</b>	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
<b>IHQ</b>	Imunohistoquímica
<b>InDels</b>	Inserções e deleções de bases na sequência de DNA
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>ISH</b>	Hibridização <i>in situ</i>
<b>MB</b>	Megabase (1 milhão de nucleotídeos)
<b>miRNA</b>	microRNAs
<b>MMR</b>	<i>DNA Mismatch Repair</i> (reparo de erro de pareamento do DNA)
<b>MSI</b>	Instabilidade de Microssatélites

<b>MSI-</b>	Ausência de instabilidade de microssatélites
<b>MSI- Low (MSI-L)</b>	Instabilidade de microssatélites baixa
<b>MSI+</b>	Presença de instabilidade de microssatélites
<b>MSI-High (MSI-H)</b>	Instabilidade de microssatélites alta/positiva
<b>MSS</b>	Estabilidade de microssatélites
<b>mut/MB</b>	mutações por MB
<b>NCI</b>	<i>National Cancer Institute</i>
<b>ng</b>	Nanogramas
<b>NGS</b>	<i>Next Generation Sequencing</i>
<b>Non-MSI-H (MSI-L/MSS)</b>	Ausência de alta instabilidade de microssatélite
<b>OMS (WHO)</b>	Organização Mundial da Saúde ( <i>World Health Organization</i> )
<b>p value</b>	Valor estatístico <i>p</i>
<b><i>p value</i><sup>a</sup></b>	Quando aplicado teste Exato de Fisher
<b><i>p value</i><sup>b</sup></b>	Quando aplicado teste Correção de continuidade
<b><i>p value</i><sup>c</sup></b>	Quando aplicado teste Qui-quadrado de Pearson
<b><i>p value</i><sup>d</sup></b>	Quando aplicado teste U de Mann-Whitney
<b>p<sup>A</sup></b>	Valor estatístico na condição de análise A
<b>p<sup>B</sup></b>	Valor estatístico na condição de análise B
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PD1</b>	<i>Programmed death-1</i>
<b>PD-L1</b>	<i>Programmed death-ligand 1</i>
<b>PD-L1-</b>	Ausência da expressão de PD-L1
<b>PD-L1+</b>	Presença da expressão de PD-L1
<b>qPCR</b>	PCR quantitativa em tempo real
<b>RNAseq</b>	<i>RNA sequencing</i>

<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RP</b>	Resposta Parcial
<b>SNVs</b>	<i>Single Nucleotide Variations</i>
<b>TA</b>	Temperatura Ambiente
<b>TCGA</b>	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TNM</b>	Classificação de Tumores Malignos (considerando tamanho tumoral, status linfonodal e metástase à distância)
<b>TPS</b>	<i>Tumor Positive Score</i>
<b>VMS</b>	<i>Ventana Medical Systems</i>
<b>VQSR</b>	<i>Variant Quality Score Recalibration</i>
<b>WES</b>	<i>Whole Genome Sequencing</i>

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1-</b> Características clínicas da casuística de Adenocarcinoma Gástrico. ....	41- 43
<b>Tabela 2-</b> Ancestralidade Genômica de casos AdG-EBV e AdG-MSI. ....	57
<b>Tabela 3-</b> Carga mutacional tumoral no AdG-EBV e AdG-MSI. ....	63
<b>Tabela 4-</b> Assinaturas relacionadas ao câncer gástrico (CG) do banco COSMIC identificadas no grupo MSI+. ....	71
<b>Quadro 1-</b> Taxas de risco associadas aos grupos EBV+ e MSI+ para sobrevidas câncer específica e livre de recidiva (5 anos). ....	51

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Panorama geral das características similares ou distintas entre os subtipos AdG-EBV e AdG-MSI. ....	31
<b>Figura 2-</b> Tendência de sobrevida câncer específica em 5 anos de casos AdG-EBV. ....	51
<b>Figura 3-</b> Tendência de sobrevida livre de recidiva em 5 anos de casos AdG-EBV. ....	52
<b>Figura 4-</b> Tendência de sobrevida câncer específica em 5 anos de casos AdG-MSI. ....	53
<b>Figura 5-</b> Tendência de sobrevida livre de recidiva em 5 anos de casos AdG-MSI. ....	53
<b>Figura 6-</b> Tendência de (A) sobrevida câncer específica e (B) livre de recidiva em 5 anos de casos AdG-MSI e AdG-EBV considerando três grupos de análise: MSI-/EBV-; MSI-/EBV+; MSI+/EBV. ....	55
<b>Figura 7-</b> Distribuição da Ancestralidade Genômica nos casos AdG-EBV e AdG-MSI. ....	58
<b>Figura 8-</b> Tendências de sobrevidas em 5 anos em casos AdG-EBV e AdG-MSI com ancestralidade europeia predominante. ....	60
<b>Figura 9-</b> Tendências de sobrevidas em 5 anos em casos AdG-EBV e AdG-MSI com ancestralidade asiática predominante. ....	61
<b>Figura 10-</b> Carga mutacional tumoral (CMT) no AdG-EBV. ....	66
<b>Figura 11-</b> Carga mutacional tumoral (CMT) no AdG-MSI. ....	67
<b>Figura 12-</b> CMT e tendências de sobrevidas em 5 anos. ....	68
<b>Figura 13-</b> Perfil de assinaturas do SBS2 e SBS13 do COSMIC relacionados ao prognóstico da coorte. ....	69
<b>Figura 14-</b> <i>Heatmap</i> de Similaridade de <i>Cosine</i> das assinaturas mutacionais indentificadas: SigneR x COSMIC. ....	72

<b>Figura 15-</b> Testes de correlação entre as assinaturas SigneR.S2 (S2) e SigneR.S3 (S3) e a idade no grupo MSI+.	74
<b>Figura 16-</b> Histograma: relação da idade no AdG-MSI.	75
<b>Figura 17-</b> Testes de Log-Rank em relação a idade e CMT no grupo MSI+.	76

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Câncer Gástrico

O câncer gástrico (CG) é uma doença heterogênea tanto sob aspectos clínicos quanto demográficos. Apesar dos esforços para sua prevenção terem sido observados, com uma queda na incidência em diversos países e das evoluções vistas no seu tratamento, o CG ainda é a quinta neoplasia mais frequente e a terceira causa de morte global por câncer <sup>1,2</sup>. Apenas em 2020, o CG foi diagnosticado mundialmente em mais de 1 milhão de pessoas (5,6% dos casos de câncer), sendo estimadas mais de 700 mil mortes (7,7% dos óbitos por câncer) para este tipo tumoral, reforçando sua maior letalidade <sup>1-3</sup>. A *American Cancer Society* estimou a ocorrência de 26.380 novos casos e 11.090 mortes (homens: 15.900 casos e 6.690 mortes; mulheres: 10.480 casos e 4.400 mortes) por CG nos Estados Unidos em 2022, onde essa neoplasia corresponde a 1,5% dos novos casos de câncer por ano (4). No Brasil, o CG é o quinto tipo de câncer mais frequente entre as mulheres e o terceiro entre homens. As estimativas de mortes por CG no Brasil em 2019 foram de 9.636 (7,9%) para homens e 5.475 (5%) para mulheres. Em 2020, a incidência foi de 13.360 (5,9%) de casos em homens e 7.870 (3,5%) em mulheres <sup>5,6</sup>.

A apresentação mais comum do CG é o Adenocarcinoma Gástrico (AdG), correspondente a 95% dos casos e que acomete principalmente homens de 60 a 70 anos de idade (65% acima de 50 anos) <sup>6,7</sup>. O AdG se origina na mucosa gástrica a partir da diferenciação glandular e faz parte de um grupo de tumores heterogêneos molecular e morfológicamente. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o AdG é classificado histologicamente em quatro subtipos: tubular, papilífero, mucinoso e em anel de sinete <sup>1,7</sup>. No entanto, uma das classificações mais comumente utilizadas na clínica permanece a de Lauren (1965), que reconhece os subtipos histológicos principais como sendo intestinal, difuso ou misto <sup>8</sup>. No subtipo intestinal de Lauren, as células neoplásicas apresentam-se em estruturas tubulares bem definidas gerando uma formação glandular e tornando o carcinoma geralmente mais diferenciado. No subtipo difuso, as células neoplásicas estão individualizadas infiltrando a parede gástrica, não há formação glandular e o carcinoma é menos diferenciado. O subtipo misto agrega características dos dois subtipos anteriores <sup>8-10</sup>.

Além das denominações baseadas em aspectos histológicos, em 2014 o AdG recebeu uma classificação molecular pelo TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) estabelecendo quatro subtipos:

1- tumores positivos para o vírus Epstein-Barr (EBV+); 2- tumores com instabilidade microssatélite (MSI+); 3- tumores com instabilidade cromossômica (IC) e 4- tumores genomicamente estáveis (GS) <sup>11</sup>. Dentre estes subtipos moleculares, dois deles se destacam por apresentarem melhores respostas terapêuticas em estudos clínicos e têm sido apontados na literatura como indicadores de bom prognóstico <sup>12</sup>. São esses, o AdG positivo para a presença do EBV, AdG-EBV; e o que apresenta MSI+, AdG-MSI. Além do estudo do TCGA que definiu esses subtipos, outros autores investigaram a relevância clínica dos mesmos. Em uma análise a partir de 699 amostras cirúrgicas de pacientes de câncer gástrico e gastroesofágico submetidos a gastrectomia, foi demonstrada associação entre o subtipo EBV+ e o melhor prognóstico, enquanto pacientes do subtipo GS apresentaram pior prognóstico <sup>12</sup>. Atualmente, o EBV é investigado como marcador relevante nos AdGs, e tem sido inclusive sugerido como biomarcador com impacto terapêutico, principalmente ao uso de inibidores de *checkpoints* imunes <sup>12-15</sup>. Já em relação ao subtipo MSI+, este já é estabelecido como biomarcador no AdG para indicação de terapia com o anticorpo monoclonal pembrolizumabe ou outros fármacos anti-PD1, por exemplo, é reconhecido como uma classificação molecular tanto pelo TCGA como pelo “*Asian Cancer Research Group*” (ACRG) <sup>16</sup>. A instabilidade se caracteriza pelo acúmulo de alterações (deleções ou inserções) nas unidades de repetição de microssatélites, o que é indicativo de deficiência em certos sistemas de reparo de DNA <sup>16</sup>. Os microssatélites são pequenas repetições em *tandem* que apresentam trechos de nucleotídeos repetidos (1 a 9 unidades de repetição) <sup>12,17-19</sup>. Na literatura, o perfil da MSI no CG é tratado por algumas nomenclaturas que podem variar de acordo com o autor. Os casos positivos para MSI, são geralmente chamados MSI-High, que significa que há alta presença da instabilidade. Já os casos negativos muitas vezes são chamados de Non-MSI-High, que engloba situações quando a instabilidade é baixa ou inexistente, neste último caso, também podem ser denominados MSS, sendo microssatélites estáveis; e quando a MSI é baixa, também pode ser referido como MSI-Low <sup>11,17</sup>.

Em geral, para os AdGs, a base de tratamento com intuito curativo ainda é a ressecção gástrica, cirúrgica ou endoscópica. O tratamento vai ser definido de acordo com o estadiamento do tumor, havendo combinações entre diferentes protocolos conforme indicação clínica, incluindo além da cirurgia, radioterapias, quimioterapias, terapias-alvo e imunoterapia. A imunoterapia tem sido uma alternativa principalmente quando já foram usadas abordagens quimioterápicas sem sucesso ou com efeitos colaterais não toleráveis <sup>20,21</sup>. Dessa forma, busca-se a melhor alternativa para cada paciente, inclusive alguns imunoterápicos foram recentemente aprovados

pela ANVISA para o CG no Brasil <sup>22-25</sup>. O AdG-MSI e o AdG-EBV são muito imunogênicos devido, à elevada presença de mutações no AdG-MSI e da quantidade de antígenos virais no AdG-EBV, o que leva à produção de neoantígenos e os tornam fortes candidatos ao tratamento com imunoterápicos <sup>11,12</sup>. No entanto, a frequência desses subtipos varia bastante na literatura, devido principalmente a representatividade precária das coortes estudadas ao redor do mundo, incluindo o Brasil, onde a relevância desses marcadores no AdG carece de investigações mais aprofundadas <sup>26-28</sup>.

Interessantemente, é descrito na literatura que tanto a incidência do CG, como os fatores envolvidos no prognóstico da doença também variam geograficamente <sup>29</sup>. Em países asiáticos observa-se uma alta incidência de CG, e também bons resultados no que se refere à resposta terapêutica de seus pacientes <sup>2,30</sup>. Enquanto os indivíduos japoneses apresentam uma sobrevida em 5 anos de 40-60%, os pacientes dos Estados Unidos e Europa têm sobrevida de apenas 15-20%, evidenciando um potencial do impacto da etnia e outros fatores no prognóstico do AdG <sup>26</sup>. Por muito tempo, se atribuiu estes resultados discrepantes às formas de tratamento, como por exemplo, maior percentagem de cirurgias mais agressivas no continente asiático. Atualmente, estudos indicam que fatores ambientais, socioeconômicos, a etnia e a própria biologia tumoral devem ter um papel na sobrevida <sup>19,31,32</sup>. As relações entre o AdG e os elementos discutidos acima têm sido estudadas em diversos centros mundialmente <sup>13,19,33</sup>. Entretanto, ainda não temos números concretos em relação à incidência destes subtipos moleculares no Brasil, o que demonstra a necessidade de investigações que considerem estes fatores em conjunto em nossa população. Deste modo, buscamos neste trabalho identificar a prevalência destes elementos nos subtipos de AdG-EBV e AdG-MSI em diferentes contextos, esperando assim contribuir para a compreensão dos fatores envolvidos no prognóstico desta neoplasia localmente.

## **1.2. O vírus Epstein-Barr e o câncer gástrico**

O número de estudos sobre o AdG e os diversos fatores relacionados a esta neoplasia é crescente <sup>12,34</sup>. Uma das maiores áreas de interesse se refere à resposta ao tratamento, onde a composição da microbiota gastrointestinal parece ter um papel relevante, em conjunto com características moleculares específicas entre pacientes respondedores e não-respondedores. Além disso, a disbiose gástrica parece ter papel relevante na carcinogênese, principalmente em estudos que buscam evidenciar a importância do papel dos microorganismos no AdG, incluindo a bactéria

*Helicobacter pylori* (Hp) e também o vírus de Epstein-Barr (EBV) <sup>31</sup>. O EBV, um gama herpes vírus da família 1, é um relevante agente neste contexto e seu papel na carcinogênese do AdG vem sendo investigado há mais de 30 anos, principalmente pela detecção de RNAs virais em secções histológicas por hibridização *in situ* <sup>13,35,36</sup>.

A relação entre a infecção pelo EBV e o estabelecimento dos AdGs já é bem conhecida na literatura científica. Ao redor do mundo a prevalência de adenocarcinoma gástrico EBV+ (AdG-EBV) é geralmente inferior a 10% (2-20%) (14). Em geral os casos EBV+ apresentam um prognóstico mais favorável se comparados a outros tipos de CG (13). Tumores AdG-EBV em geral se localizam no fundo ou corpo gástrico (62%), são mais frequentes em pacientes do sexo masculino (81%) e estão mais comumente associados à histologia intestinal. Ocasionalmente, exibem o fenótipo de carcinoma do tipo linfopitelioma <sup>37</sup>. Embora o AdG seja mais comum em pacientes de idade mais avançada, o AdG-EBV ocorre em uma idade um pouco menor. Por exemplo, um estudo recente demonstrou alta prevalência de AdG-EBV em pacientes mais jovens, com média de idade de 35 anos <sup>14,38</sup>.

Acredita-se que a infecção por EBV ocorra principalmente na infância, através de contato do vírus com a mucosa oral, onde ocorre o seu ciclo lítico e as partículas virais são produzidas e liberadas pelas células epiteliais <sup>13</sup>. O estabelecimento desta infecção latente em células não permissivas, como as células epiteliais estomacais, parece causar uma transformação maligna e conseqüentemente uma expansão clonal das células infectadas <sup>39</sup>. Nesse caso, o EBV não destrói a célula nem incorpora o seu DNA ao do hospedeiro. Este permanece como DNA epissomal e circular, que prolifera no núcleo da célula infectada como se fosse o próprio DNA do hospedeiro. Assim, durante a expansão clonal, o seu nível de DNA se mantém estável e o mesmo número de cópias é transmitido a cada célula filha: cerca de 1-185 cópias por genoma (média ~10) no AdG-EBV <sup>13,32,40</sup>. Uma vez estabelecida a infecção, o EBV passa a expressar seus RNAs, incluindo microRNAs (miRNAs), além de proteínas relacionadas à transformação celular, incluindo mediadores da mudança de fase de infecção lítica-latente <sup>41</sup>. O EBV é o primeiro vírus reportado como capaz de codificar seus próprios miRNAs. A fase latente da infecção por EBV possui três estágios, o desenvolvimento do CG é relacionado às etapas 1 e 2, onde os EBERs 1 e 2 (*Epstein-Barr virus-encoded small RNAs*), EBNA-1 (*EBV-determined nuclear antigen 1*), BART (*BamHI-A rightward transcripts*) e BARTs microRNAs são expressos <sup>14</sup>.

Os miRNAs codificados por EBV (EBERs) estimulam as vias de sinalização de TLR e RIG-I, incluindo TBK1 (*Tank-binding kinase*), que é uma proteína com importante papel na imunidade inata, regulando a resposta inflamatória e oncogênese através da ativação de fatores de transcrição reguladores de interferon (IRF3 e 7). Os EBERs são divididos em dois grupos principais: BHRF1 (*BamHI fragment H rightward open reading frame 1*) e BART miRNAs e diversos alvos destes miRNAs já foram preditos computacionalmente e estudados *in vitro*. Os BHRF1 miRNAs apresentam papel na regulação do ciclo celular da célula hospedeira e da evolução da infecção viral em vários tipos de neoplasias além do CG. Enquanto, especificamente no CG, foi observada atuação de BARTs miRNAs na regulação de genes de apoptose e ciclo celular. É bem aceito na literatura que os EBERs possuem função regulatória importante no AdG-EBV <sup>14</sup>.

Apesar das investigações envolvendo EBERs, o papel do EBV no mecanismo de carcinogênese do AdG ainda não é totalmente esclarecido. Entretanto, algumas alterações genéticas e epigenéticas, além de outros fatores no microambiente tumoral são descritos como característicos dessa relação <sup>13</sup>. A habilidade do EBV de iniciar uma cascata epigenética ainda demonstra a possibilidade de um papel indireto deste na carcinogênese do AdG. O fenótipo de metilação global não aleatória de ilhas CpG (do inglês: “*non-random global CpG-island methylation phenotype*” - CIMP) é uma anormalidade molecular importante neste contexto, levando à hipermetilação. A expressão de diversos genes supressores tumorais é suprimida devido forte metilação da sua região promotora, como *p14*, *p16*, *CDKN2A*, *TP73* e *CDH1* <sup>11,13,42,43</sup>. O EBV também interage com P53 no AdG e em outros tipos de câncer, pela expressão de proteínas como LMP1 e BARF1 que se ligam a isoformas de P53, bloqueando vias de apoptose <sup>44</sup>.

Recentemente, nosso grupo demonstrou um possível novo mecanismo que poderia explicar a carcinogênese induzida por EBV, envolvendo a transcrição aumentada de genes codificadores de enzimas da família APOBEC, evento fortemente induzido pela infecção viral. A expressão aumentada destes genes parece ter um efeito *off-target* que leva ao estabelecimento de perfis mutacionais específicos nas células gástricas como efeito *off-target* <sup>44</sup>. Em outro estudo de nosso grupo, uma coorte de 112 pacientes (35-64 anos) com AdG teve sua carga mutacional tumoral (CMT) avaliada. Destes, cinco pacientes eram EBV+, nos quais observamos uma CMT intermediária ou baixa <sup>45</sup>. Ainda, no estudo de Jing et al (2020), empregando microarranjos de expressão gênica e metilação foi identificado um conjunto de novos genes e vias envolvidas no AdG-EBV. Os genes diferencialmente expressos, incluindo *BMP4*, *CDK2*, *DEPDC1*, *SNAIL*,

*TRIP13*, *WNT11* e *WNT3*, podem ser avaliados como biomarcadores para diagnóstico e terapia baseados na sua metilação <sup>46</sup>. Alterações em vários genes induzidos por EBV (*AKT2*, *CCNA1*, *MAP3K4*, *TGFBR1*, *ACSS1*, *FAM3B*, *IHH* e *TRABD*) já foram relatadas, além da ativação de vias de sinalização como *JAK2* <sup>37,41</sup>. Inclusive, a principal alteração de números de cópias (do inglês: “*copy number variations*” – CNVs) que ocorre no AdG-EBV é a amplificação focal no cromossomo 9p24.1, que compreende *JAK2*, *CD274* e *PDCD1LG2*, levando a expressão constitutiva de *JAK2*, *PD-L1* e *PD-L2*, respectivamente <sup>14</sup>. Recentemente, Xu et al (2022) avaliaram o potencial de transcritos que parecem ser induzidos após a infecção por EBV no CG. De um grande conjunto de genes, eles selecionaram 144 com ação imuno-reguladora, incluindo 11 genes com um papel central como *hubs* reguladores imunes conforme determinado por redes de interação proteína-proteína: *CD8A*, *CXCL10*, *CCR5*, *IFNG*, *CXCL9*, *GZMA*, *GZMB*, *KLRK1*, *TBX21*, *CCL5* e *CD38*. E demonstraram que a expressão desse conjunto de 11 genes se relacionou com a resposta a imunoterapia anti-PD1, e que juntos esses genes poderiam ser usados como classificador para discriminar pacientes com CG que se beneficiariam dessa terapia <sup>47</sup>.

Alguns genes se destacam na literatura no cenário do AdG-EBV. *ARID1A*, frequentemente mutado no CG, é um gene supressor tumoral que atua como oncogene. Sua mutação mais frequentemente observada é a que resulta na proteína truncada causando a perda da função desse gene. Com isso, a expressão de *ARID1A* pode indicar o prognóstico no CG, pois sua expressão reduzida é associada a piores taxas de sobrevida <sup>12,14</sup>. De acordo com o TCGA, *ARID1A* é mutado recorrentemente não só em casos de CG EBV+ (55%), mas também em CG MSI+ (83%) (11,26). No AdG-EBV, foi observada perda de expressão desse gene mesmo quando não houve mutação <sup>14</sup>. Além disso, mutações em *ARID1A* foram observadas inclusive na mucosa gástrica não-neoplásica no AdG-EBV, o que pode estar associado a um efeito de campo de cancerização, ou mesmo à infecção por EBV, dando início à transformação maligna <sup>11,13</sup>. Outro gene importante no AdG-EBV, é o *PIK3CA*. Na coorte avaliada pelo TCGA (2014), mutações não-sinônimas foram reportadas em 12% dos casos de CG e preferencialmente nos casos EBV+, onde essas mutações de *PIK3CA* ocorreram em 80% dos casos, em contraste com 3 a 42% nos outros tipos tumorais <sup>11,42</sup>. As mutações de *PIK3CA* em pacientes AdG-EBV ocorrem principalmente no domínio quinase do gene, sugerindo que a eficácia dos inibidores de *PIK3CA* pode ser maior em casos AdG-EBV <sup>14</sup>.

As alterações epigenéticas também parecem ter um papel importante no AdG-EBV. A metilação do DNA viral é entendida pela literatura como uma tentativa de contê-lo, entretanto,

isto pode ao mesmo tempo ativar a maquinaria para iniciar sua proliferação. Com a repressão de genes supressores tumorais, pela metilação de genes codificadores de proteínas latentes e a produção de miRNAs virais, as células tumorais no AdG-EBV escapam da apoptose e evadem do sistema imune do hospedeiro<sup>13,48</sup>. Em conjunto, esses fatores favorecem um ambiente de progressão tumoral. O microambiente tumoral no AdG-EBV se caracteriza por uma alta densidade de células T CD8+ e uma baixa densidade de macrófagos CD204+ (macrófagos associados a tumores). Ambos se correlacionam com melhor prognóstico de pacientes com CG em geral e podem contribuir para o mesmo desfecho no AdG-EBV<sup>13,49,50</sup>. Também é característica neste contexto a alta expressão de PD-L1 pelas células AdG-EBV e células imunes infiltradas (macrófagos e linfócitos)<sup>14,15</sup>, abrindo espaço para o uso de inibidores de checkpoints imunológicos na imunoterapia destes tumores, o que parece ocorrer em cerca de 40% dos casos de CG<sup>51</sup>. A interação proteica entre o receptor de células T, PD1 (*programmed death-1*) e seu ligante PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) é um dos mecanismos mais comuns subjacentes à imunoterapia. Quando há interação PD-1/PD-L1 as células T deixam de atacar as células não-tumorais do organismo. E no contexto de malignidade, isso funciona como um fator inibitório na última etapa do ciclo de imunidade do câncer, induzindo o comprometimento funcional das células T antígeno-específicas e leva à evasão imune pelos tumores. A terapia de bloqueio de PD-1/PD-L1 com anticorpos antagonistas obteve grande sucesso em ensaios clínicos para pacientes com vários tipos de câncer e foi aprovada para uso na prática clínica, incluindo para o CG<sup>23,52</sup>.

Um estudo prospectivo publicado recentemente observou a expressão de PD-L1 em 7 de 9 pacientes de AdG-EBV que foram submetidos a diferentes regimes quimio e imunoterápicos. Foi reportada resposta parcial (RP) em 16,7% na monoterapia e de 66,7% quando combinada à imunoterapia. Em geral, 33,3% dos pacientes atingiram RP. Interessantemente, três pacientes que apresentaram RP após imunoterapia tinham expressão positiva de PD-L1, com sobrevida de 10, 13 e 18 meses até o último seguimento avaliado. O estudo sugere um valor prognóstico para a infecção pelo EBV combinada ao status PD-L1+ o que permite supor maiores chances de resposta à imunoterapia<sup>15</sup>. Em um outro estudo clínico de fase II, avaliou-se a eficácia do imunoterápico Pembrolizumabe (anticorpo anti-PD-1) em AdG metastático como terceira linha de tratamento. A casuística incluiu 61 pacientes, sendo 6 casos EBV+ e 7 MSI-High (MSI-H) (*i.e.*, instabilidade de microssatélites alta/positiva). A taxa de resposta global foi 50% em pacientes PD-L1 positivos; 85,7% em MSI-H e 100% em pacientes EBV+. Os dados sugerem que a eficácia nos casos EBV+ independe da carga mutacional do tumor, ou do status de PD-

L1 e até mesmo de MSI, colocando o status de EBV como biomarcador informativo para monoterapia com esta droga <sup>13,53</sup>. Ademais, um trabalho recém-publicado apontou excelentes resultados terapêuticos para este mesmo fármaco em pacientes de AdG-EBV e AdG associado à instabilidade de microssatélites (AdG-MSI) <sup>54</sup>.

Existem outros mecanismos comuns de imunidade adaptativa além da alta expressão de PD-L1 no AdG-EBV e AdG-MSI. Esses dois subtipos de classificação molecular (TCGA) apresentam aspectos similares, como uma assinatura imune de interferon-gama (INF- $\gamma$ ) no microambiente tumoral, onde a densidade de células CD8+ se correlaciona com a expressão de PD-L1 nos dois casos. Portanto, esses subtipos podem representar alvos informativos para a imunoterapia devido aos respectivos mecanismos moleculares de evasão tumoral. Entretanto, é descrito na literatura que a metilação do promotor do gene *MLH1* ocorre no AdG-MSI e não no AdG-EBV, e o inverso para o gene *CDKN2/A*. Isto pode ser uma das bases do consenso existente na literatura de que esses subtipos são mutuamente exclusivos no contexto do AdG <sup>13,14,55</sup>.

### **1.3. A instabilidade de microssatélites e o câncer gástrico**

Assim como no subtipo EBV+, o AdG-MSI também é relacionado a um bom prognóstico na literatura e é associado a uma boa resposta em estudos clínicos com tratamento imunoterápico no CG metastático <sup>16,37</sup>. Em 1993 a instabilidade de microssatélites presentes ao longo do genoma foi descrita em tumores colorretais, onde seu fenótipo foi extensivamente caracterizado <sup>17</sup>. Sua relevância foi demonstrada em outros tumores, incluindo o CG. A MSI tem sido observada com frequência entre 1-30% em vários tipos de neoplasias malignas <sup>13,19,20</sup>. No AdG, a prevalência do status MSI+ apresenta considerável variação na literatura, sendo cerca de 7-25% dos casos <sup>16,26</sup>. O AdG-MSI está associado a uma idade mais avançada ( $\geq 65$  anos/ média 72) e ao sexo feminino; geralmente ocorrendo no antro gástrico e relacionado à histologia intestinal <sup>26,37</sup>. Além disso, a maioria dos casos CG MSI+ parece ter o diagnóstico em estágios iniciais da doença (TNM I ou II), com menor acometimento linfonodal, e menor propensão à invasão da camada serosa <sup>26</sup>.

A instabilidade de microssatélites é uma consequência da deficiência na maquinaria do sistema de reparo de DNA do tipo mismatch (MMR). Esse sistema corrige erros ocasionados pela DNA-polimerase durante eventos de replicação celular e compreende proteínas bem conhecidas como MSH6 e MSH2, que atuam no reconhecimento de nucleotídeos inseridos equivocadamente; e

MLH1 e PMS2/1, responsáveis por fazer a troca pela base correta. O silenciamento epigenético de *MLH1* através da metilação do seu promotor é reportado como a principal causa da deficiência da MMR no CG associado à MSI, enquanto mutações nos genes *MLH1* e *MLH2* são menos frequentes (15 e 12% respectivamente) <sup>13,17,26,37</sup>. O papel da MSI como marcador de estabilidade genoma humano tem sido estudado há décadas em diversos tipos tumorais <sup>26</sup>. Atualmente o padrão ouro de diagnóstico para sua detecção se baseia na avaliação de pelo menos cinco marcadores de instabilidade dentre os muitos possíveis. A maioria destes marcadores vêm sendo combinados em um painel de mononucleotídeos com polimorfismo de número de repetições (NR-21, NR-24, BAT-25, BAT-26, NR-27/MONO-27) <sup>17</sup>. Dependendo do número de marcadores que apresentam instabilidade, os tumores são classificados como portadores de alta instabilidade (MSI-High/ MSI-H - pelo menos 3/5 dos marcadores mostrando instabilidade); baixa instabilidade (MSI-Low/ MSI-L - alteração em um ou dois marcadores); ou microssatélites estáveis (MSS - sem alterações detectadas) <sup>16</sup>. Artigos recentes têm demonstrado a equivalência de abordagens baseadas em *Next Generation Sequencing* (NGS) e painéis de mononucleotídeos, para a determinação do status de MSI, inclusive com vantagens decorrentes do sequenciamento mais amplo e mais informativo <sup>17,56-58</sup>. Para melhor compreensão da leitura, daqui em diante, nos referimos a casos MSI+ como aqueles com status MSI-H, portanto portadores de AdG-MSI; e os casos negativos como MSI-. Englobando assim a descrição como negativos os casos MSI-L e MSS.

É reportado na literatura que o AdG-MSI apresenta um fenótipo hipermutado <sup>26</sup>. Com alta frequência de mutações que levam à mudança na janela de leitura (*frameshift*) e que podem levar à inativação de genes supressores tumorais importantes, além da criação de neoantígenos <sup>26</sup>. Além disso, frequentes mutações *missense* (perda de sentido) podem ativar oncogenes <sup>37,59</sup>. Através de uma análise por sequenciamento do genoma completo, o TCGA apontou 37 genes significativamente mutados no CG associado à MSI. Esses genes são envolvidos em processos chave como a manutenção da integridade do genoma (*hMSH6*, *hMSH3*, *MED1*, *BLM*, *RAD50*, *ATR* e *MRE11*), regulação/progressão do ciclo celular (*TP53*, *TCF4*, *IGFIIR*), remodelamento da cromatina e morte celular (*APAF1*, *BCL10*, *FAS*, *CASPASE5*, *BAX* e *RIZ*), além da regulação de transcrição e transdução de sinal. Ademais, variantes frequentes foram descritas em genes que fazem parte do complexo principal de histocompatibilidade de classe I, como *B2M* e *HLA-B*, importantes no quadro do fenótipo de MSI pois reduzem a apresentação de antígenos, colaborando para evasão tumoral ao sistema imune <sup>26</sup>.

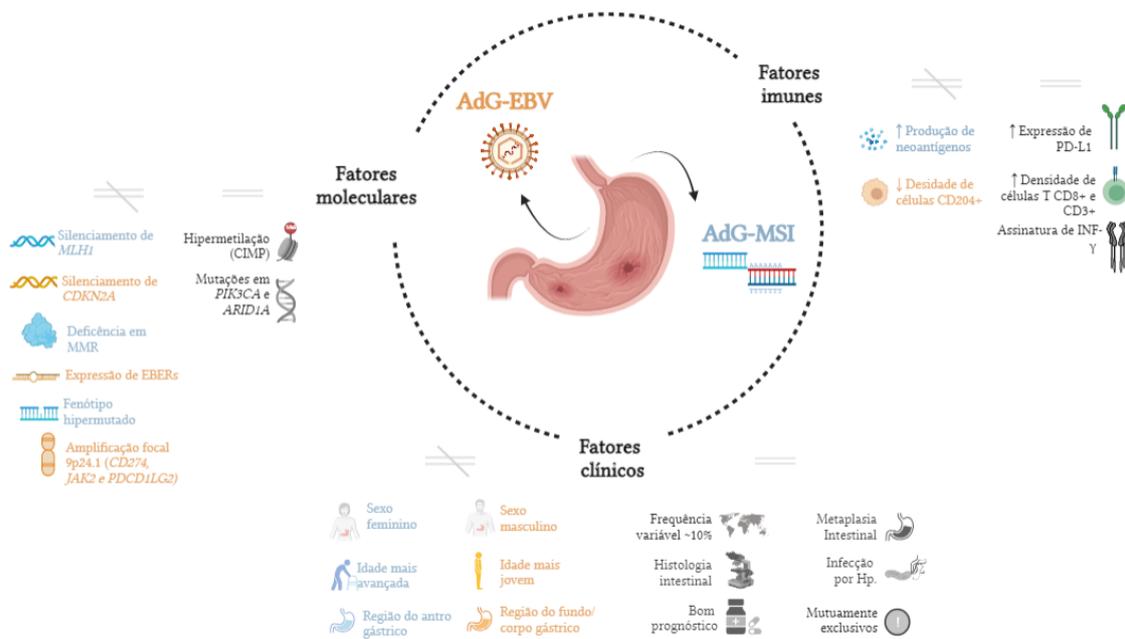
Assim como no AdG-EBV, existem alterações em alguns genes que se destacam no contexto do AdG-MSI, incluindo mutações em *PIK3CA*, que segundo estudo reportado pelo TCGA foi presente em 42% dos casos MSI+ de CG analisados. Ainda, Barbi et al. (2010), demonstraram que somente pacientes MSI+ tinham a variante mais comum de *PIK3CA* (H1047R - exon 20)<sup>60</sup>. Polom et. al (2018), demonstraram que pacientes MSI+ com *PIK3CA* mutado apresentaram sobrevida global melhor em relação casos MSI+ com gene selvagem, inclusive o melhor resultado foi observado para casos com mutações no exon 20 de *PIK3CA*<sup>61</sup>. Outro gene em comum nos cenários dos dois subtipos é o *ARID1A*, com frequência de mutações de 83% no AdG-MSI<sup>26,61</sup>.

Além dos fatores moleculares, a questão do papel do microambiente tumoral nos AdGs já foi levantada por diversos autores<sup>26,53</sup>. No AdG-MSI, foi descrita a relevância da produção massiva de peptídeos tumor-específicos pelas células de CG, proporcionando o estabelecimento de um microambiente tumoral permissivo à inflamação e outras características como a alta densidade de infiltrado linfoide (células T CD8+ e FOXP3+), que foram correlacionadas a um melhor prognóstico em casos MSI+. Nesse sentido, foi descrito por Chiaravalli et al. (2006) um alto número de células T CD8+ e CD3+, tanto no AdG-MSI quanto AdG-EBV, relacionando a um melhor prognóstico<sup>62</sup>. Ademais, como já mencionado, a alta expressão de PD-L1 também é reportada no AdG-MSI. Recentemente, Morihiro et al. (2019) reportaram que a avaliação combinada da expressão de PD-L1 e status MSI ou do nível de células CD8+ possui maior valor prognóstico do que a avaliação isolada de PD-L1<sup>52</sup> sugerindo que é necessária uma melhor compreensão do microambiente tumoral para definição de estratégias terapêuticas<sup>26,51</sup>. Nesta mesma linha, Cho et al. (2018) classificam o microambiente tumoral baseado na expressão de PD-L1 e na densidade de células T CD8+ numa coorte de CG (43 pacientes EBV+, 79 MSI-H e 125 EBV-/MSS) com intuito de entender melhor as interações imunes no AdG e apontar soluções para seleção de pacientes à imunoterapia<sup>26,51</sup>.

A base racional para o uso de imunoterápicos para casos MSI+ provém do fenótipo hipermutado característico deste subgrupo, pela conseqüente expressão abundante de peptídeos que atuam como neoantígenos e são capazes de recrutar e ativar fortemente os linfócitos T<sup>20</sup>. O estudo clínico KEYNOTE-012 demonstrou primeiramente a atividade do imunoterápico pembrolizumabe determinando uma resposta parcial (22%) em casos de CG PD-L1+. Em seguida, a análise genômica apontou que 17% dos pacientes eram MSI+ e dentro deste grupo de casos MSI+ e PD-L1+, a resposta esperada foi observada em 50% dos casos. Já no estudo clínico de fase II, KEYNOTE-059, onde a segurança e eficácia do mesmo fármaco foi avaliada,

demonstrou-se que pacientes MSI+, embora sendo apenas 7 casos, obtiveram taxa de resposta esperada de 57,1% (4/7) em comparação a casos MSS, onde a mesma taxa foi de somente 9%. Em vista das evidências reportadas pelos estudos, o pembrolizumabe foi aprovado pela FDA por enquanto para tratamento de casos de CG metastáticos PD-L1+ e para tumores sólidos não ressecáveis ou metastáticos com deficiência de MMR/MSI, independente do sítio de tumor primário <sup>26</sup>.

Entre o AdGs MSI+ e EBV+ existem algumas associações em comum descritas na literatura e já mencionadas aqui (figura 1). Entre elas estão também a infecção por *H. pylori* (Hp), presença de metaplasia intestinal e AdG do subtipo intestinal <sup>37,59</sup>. Eles também compartilham características do fenótipo epigenético CIMP (apesar de diferentes aspectos dentro deste fenótipo) <sup>11,43</sup>, bem como determinados genes mutados, além da presença intensa de infiltrado linfoide, e alta taxa de expressão de PD-L1 <sup>13,59</sup>. Diante da relevância clínica da relação entre estes marcadores e o AdG, mais esforços devem ser empenhados para entender o papel da MSI como um todo, incluindo estratégias terapêuticas diversas <sup>16,63</sup>. Para isso, um ponto chave é a escolha dos marcadores de instabilidade na análise de MSI <sup>17</sup>, bem como a metodologia empregada, visto que em muitas casuísticas a frequência deste subtipo parece ser baixa, talvez um efeito decorrente de coortes limitadas. Atualmente, métodos moleculares de nova geração aliados a métodos computacionais desenvolvidos e empregados para a identificação do status de MSI têm sido usados para correlacionar estes dados com uma predição de sobrevida e resposta ao tratamento, incluindo o bloqueio de inibidores de *checkpoints* imunes <sup>17,64</sup>.



**Figura 1-** Panorama geral das características similares ou distintas entre os subtipos AdG-EBV e AdG-MSI. Em preto, características similares, em azul, relacionadas ao AdG-MSI e em laranja, ao AdG-EBV. FONTE DA ILUSTRAÇÃO: Autoria Própria (criado pelo autor através da ferramenta *BioRender.com*). FONTE DAS INFORMAÇÕES: Adaptadas de Burke (1990); Wu (1990); Fukayama (2010); Matsusaka (2011); TCGA (2014); Park (2016); Ajani (2017); Baudrin (2018); Kohlruss (2019); Fukayama (2019); Wang (2019); Morihiro (2019); Haag (2019); Pietrantonio (2019); Xie (2020); Nakamura (2021); Puliga (2021).

#### 1.4. Ancestralidade genômica no AdG-EBV e AdG-MSI

Como mencionado anteriormente, existem discrepâncias nas taxas de sobrevida entre pacientes de países asiáticos e europeus, além de consideráveis variações geográficas em relação à etiologia e à incidência do câncer gástrico. Estudos têm apontado que diferentes fatores podem ter papel nesse fenômeno<sup>2,29,30,32,65,66</sup>. Kim et al. (2010) avaliaram a sobrevida de 13.084 pacientes com AdG de uma coorte norte-americana. Os pacientes foram tratados entre 1988 a 2006 e distribuídos entre os denominados brancos (39%), asiáticos (22%), hispânicos (11%) ou negros (2%). Nesta coorte, os pacientes asiáticos apresentaram sobrevida significativamente superior aos demais grupos (16,3 meses *versus* 8,7, 8,4 e 7,9 para brancos, hispânicos e negros, respectivamente;  $p < 0,001$ ). O mesmo perfil se manteve entre os pacientes que realizaram cirurgia com intenção curativa, assim como para probabilidade de sobrevida após o procedimento (HR 0,79, 95% CI 0,71-0,88;  $p < 0,001$ ). Este estudo concluiu que o prognóstico diferencial dos pacientes foi independente de fatores clínico-patológicos e teve o grupo asiático

com resultados superiores. Estes dados contribuem para a relevância do entendimento da influência da ancestralidade genômica no prognóstico dos pacientes com AdG <sup>32</sup>.

Como já relatado na literatura, países orientais apresentam maiores taxas de incidência e sobrevida em comparação a países ocidentais. No entanto, não se deve necessariamente assumir que um paciente asiático sempre terá melhor prognóstico, pois podem haver diferenças ambientais, na dieta ou no comportamento do CG entre pacientes asiáticos de origem e/ou vivendo em países orientais ou ocidentais. Visando compreender essas relações, Rahman et al. realizaram uma análise secundária do estudo clínico randomizado CALGB 80101, onde 546 pacientes de CG não metastáticos foram tratados com regimes quimio e radioterápicos adjuvantes pós-ressecção nos Estados Unidos. Quanto à sobrevida, este estudo concluiu que os pacientes americanos asiáticos obtiveram melhor resultado tanto em sobrevida global como livre de recidiva comparado aos outros grupos raciais norte-americanos (brancos, negros e hispânicos). É importante ressaltar que todos os pacientes foram tratados com o mesmo padrão de cirurgia. Além da etnia, os investigadores avaliaram a influência de outros fatores no resultado, dos quais também se destacaram como relacionados à melhor sobrevida, o estadiamento T, a taxa de comprometimento linfonodal e o sítio primário do tumor <sup>29</sup>.

Em um estudo de doutorado de nosso grupo <sup>45</sup>, a ancestralidade genômica predominante em uma coorte de 112 pacientes com AdG foi inferida a partir de leituras *off-target* de um painel gênico. Este estudo observou em nossa coorte, a predominância de ancestralidade europeia, seguida da asiática na população estudada. Interessantemente, foi vista uma possível diferença em relação a positividade para EBV entre os grupos étnicos, com a ancestralidade africana apresentando dois dos cinco casos EBV+ da coorte total (40%) <sup>45</sup>. Esses dados corroboram o que foi descrito por outro estudo com uma coorte maior, quanto à prevalência superior de AdG-EBV em negros na população brasileira <sup>67</sup>. O resultado é interessante, visto que a infecção por EBV também parece ser mais frequente na África, onde este vírus é fortemente associado a outras neoplasias, como o linfoma de Burkitt <sup>68</sup>. Essa relação precisa ser ainda mais profundamente investigada no Brasil, que dispõe de uma população com ampla representatividade étnica e alta miscigenação. Estudos de diversos países, ocidentais e orientais, relatam a associação de EBV ao AdG, mostrando que essa é uma relação que vai além de fronteiras culturais e geográficas <sup>32,63,69,70</sup>. Covarlán et al, ressaltam a importância de estudarmos a América do “novo mundo”, que devido aos movimentos migratórios dos últimos séculos, oferece uma oportunidade para entendermos o papel da ancestralidade no desenvolvimento de doenças como o câncer. Estudos neste cenário indicam que a mistura das

ancestralidades europeia (principalmente espanhola) e ameríndia é fortemente associada a maior incidência de AdG-EBV quando comparado ao observado em populações de ancestralidade japonesa com herança branca/não-hispânica tanto nos Estados Unidos (15,9%) quanto no Brasil (11,2%)<sup>27,71</sup>.

No que diz respeito à relação entre MSI e ancestralidade, é observado que pacientes AdG brancos/europeus de AdG quando são MSI+ apresentam melhor prognóstico<sup>33</sup>. Com intuito de avaliar esse panorama em uma coorte asiática, foi avaliado no estudo clínico ARTIST o impacto prognóstico da MSI em 393 amostras de ressecção tumoral dos pacientes, onde 35 (9%) tinham o status MSI-H. Comparado ao grupo MSS, os pacientes MSI-H apresentaram melhor prognóstico, com sobrevida livre de eventos em 3 anos de 85,4% (MSI-H) *versus* 76,3% (MSS) (p=0,122). Além disso, os pacientes asiáticos AdG-MSI se sobressaíram (91,4%) aos MSS (81,7) (p=0,046). Em concordância com a literatura, este estudo demonstrou a relação do fenótipo MSI-H com um bom prognóstico<sup>33</sup>. Se atentarmos ao fato de que pacientes asiáticos a princípio demonstraram melhores resultados no tratamento do AdG de modo geral<sup>32</sup>, faz sentido imaginar que a ancestralidade genômica possa ter relevante impacto em diferentes fenótipos e panoramas clínicos, especialmente em uma população extremamente miscigenada como a brasileira e que carece de estudos abrangentes nesse contexto. É importante ressaltar que a incidência do AdG-MSI é bastante variável na literatura, o que inclusive reflete uma falta de heterogeneidade nas populações avaliadas pelos estudos ao redor do mundo. Por exemplo, na coorte analisada pelo TCGA a maioria dos pacientes foram asiáticos ou brancos, enquanto uma pequena parcela era de pacientes negros e nenhum paciente era hispânico. No entanto, já foi reportado na literatura que a incidência de CG é maior em pacientes hispânicos/latinos comparados a brancos não-hispânicos, deixando notória a necessidade de estudos que tenham maior representatividade étnico-racial para melhor compreensão da prevalência do AdG-MSI de forma global<sup>26</sup>.

Diante do exposto até o momento, podemos constatar que especialmente no Brasil os fatores envolvidos no desenvolvimento e no desfecho de casos AdG-EBV e AdG-MSI carecem de investigações mais robustas. Principalmente ao considerarmos características epidemiológicas e étnicas da nossa população de modo que possibilite a aplicação prática destas classificações no manejo do paciente. Dessa maneira, neste estudo avaliamos a distribuição destes subtipos em uma coorte de pacientes portadores de AdG tratados no A.C.Camargo Cancer Center dentre os anos de 2016-2021, visando compreender o papel destes marcadores e seu impacto no prognóstico no AdG no Brasil.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Determinar o status MSI e a presença de DNA de EBV em uma coorte de pacientes com adenocarcinoma gástrico e investigar sua relevância prognóstica.

### **2.2. Objetivos específicos**

- I. Determinar a presença e a quantidade relativa de DNA de EBV em amostras gástricas (fluidos e biópsias teciduais) de pacientes com AdG, e correlacionar estes achados com características clínico-patológicas e moleculares;
- II. Determinar o status MSI em amostras tumorais de indivíduos com AdG e investigar sua relação com as características clínico-patológicas e moleculares dos pacientes;
- III. Inferir, a partir de dados de exoma, a ancestralidade genômica dos pacientes incluídos no estudo, e investigar sua possível correlação com o status de MSI e EBV e os fatores prognósticos;
- IV. Determinar o perfil molecular dos tumores (MSI, ancestralidade & assinaturas e carga mutacional) e avaliar sua correlação com a classificação das amostras nos grupos de EBV e MSI e seu impacto prognóstico.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Casuística de estudo, coletas e processamento das amostras

Este trabalho é afiliado ao projeto Temático financiado pela Fapesp “Epidemiologia e genômica de adenocarcinomas gástricos no Brasil” (2014/26897-0), em andamento no Laboratório de Genômica Médica do *A.C. Camargo Cancer Center (ACCCC)* desde 2016. Todas as análises aqui realizadas foram elencadas nas abordagens originalmente planejadas para este projeto, tendo sido submetidas e aprovadas pelo CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) institucional sob o número 2134/15L (ANEXO I). As amostras biológicas analisadas neste projeto foram obtidas de participantes do projeto temático que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) voluntariamente (ANEXO II).

Foram selecionados 198 pacientes previamente recrutados pelo projeto Temático que conta atualmente com mais de 400 pacientes diagnosticados com AdG<sup>28</sup>. De acordo com os critérios pré-estabelecidos no projeto Temático, foram incluídos casos definidos pelo diagnóstico de Adenocarcinoma Gástrico de acordo com a CID-O3, Topografia C16 (CID10)<sup>72</sup>, idade superior a 18 anos e de ambos os sexos. Foram excluídos pacientes com síndrome de câncer familiar que predispõe ao desenvolvimento de câncer gástrico, tais como a Síndrome Hereditária de Câncer de Cólon Não Polipoide (HNPCC), Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), Síndrome de Peutz-Jeghers e o câncer gástrico hereditário de tipo difuso (HDGC). Além disso, os participantes não poderiam possuir dificuldades de entendimento dos procedimentos, devido a distúrbios mentais ou outras causas. Além das coletas prospectivas, selecionamos 28 pacientes diagnosticados com AdG de 2000 a 2012 também tratados no ACCCC que foram parte da casuística do trabalho de doutoramento do Dr. Helano Freitas<sup>45</sup>. Para estes pacientes, analisamos as peças cirúrgicas coletadas antes de qualquer tratamento neoadjuvante.

As amostras de biópsia tecidual e fluidos gástricos foram coletadas durante o procedimento endoscópico de diagnóstico. Antes do procedimento, os pacientes foram instruídos, entre outras recomendações, a realizarem um jejum líquido e sólido de pelo menos 8 horas. Inicialmente, o estômago dos pacientes é lavado, e este fluido gástrico, que seria descartado durante o procedimento, coletado (até 50ml) e processado, o que inclui aferição do pH e neutralização (quando necessário, para evitar a hidrólise espontânea do DNA), seguido de armazenamento a -20°C. As biópsias foram coletadas e armazenadas pelo Biobanco da instituição em meio Tissue-Tek O.C.T a -80°C. O DNA destes materiais foi extraído de acordo com protocolos já

estabelecidos pelo nosso grupo <sup>28</sup>, sendo o kit All Prep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen) para as biópsias, com protocolo de acordo com instruções do fabricante; e o método tradicional de fenol-clorofórmio para os fluidos gástricos, como descrito abaixo.

- Protocolo para extração de DNA de fluido gástrico: método Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico (25:24:1)
  1. Em tubo cônico de 2,0 ml: aliquotar 800ul de amostra e em seguida adicionar 500ul de tampão de digestão *Cell Lysis Solution* (Qiagen).
  2. Adicionar 15ul de Proteinase K 20ug/ul.
  3. Incubar a 55°C em banho úmido por 1 hora.
  4. Adicionar 500ul de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) no tubo com o lisado. Homogeneizar no vórtex por 1 minuto até o conteúdo do tubo ficar com coloração branca.
  5. Centrifugar por 10 minutos a 13.200 rpm em temperatura ambiente (TA).
  6. Transferir 950ul (máximo) da fase aquosa (superior) para um novo tubo de 2,0 ml. Adicionar 500ul de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). Homogeneizar no vórtex até o conteúdo do tubo ficar com coloração branca.
  7. Centrifugar por 10 minutos a 13.200 rpm em TA.
  8. Adicionar direto no tubo 500ul de clorofórmio. Homogeneizar no vórtex até o conteúdo do tubo ficar com coloração branca.
  9. Centrifugar por 10 minutos a 13.200 rpm em TA.
  10. Transferir 950ul (máximo) da fase aquosa (superior) para um novo tubo de 2 ml e adicionar 800ul de álcool etílico (EtOH) 100% gelado e mais 10% do volume (80 ul) de acetato de sódio 3M pH 5,2. Homogeneizar por inversão (ou no vortex rapidamente).
  11. Incubar por no mínimo 1 hora a -20 °C (ou máximo de tempo *overnight*).
  12. Centrifugar por 30 minutos a 14.000 rpm a 4 °C.
  13. Remover com cuidado por inversão o sobrenadante.
  14. Adicionar 1 ml de EtOH 70% gelado. Destacar delicadamente o *pellet* do fundo do tubo na primeira lavagem. Centrifugar por 5 minutos a 14.000 rpm a 4 °C.
  15. Repetir o passo anterior até a etapa de lavagem. Centrifugar por 3 minutos a 14.000 rpm a 4 °C.
  16. Remover com cuidado por inversão o sobrenadante e retirar o excesso do etanol com a pipeta.

17. Secar o pellet a 42°C ou na bancada até não haver mais resquícios de etanol (colocar tubos termobloco com a tampa aberta)
18. Ressuspender o pellet com 100ul de H<sub>2</sub>O *nucleases free*.
19. Incubar a 55 °C por 10 minutos no termobloco. Caso o *pellet* não tenha se dissolvido, deixar *overnight* a 4°C.
20. Medir a concentração do DNA no aparelho Qubit usando o kit dsDNA High Sensitivity.

### 3.2. Detecção de DNA viral de EBV nas amostras

Investigamos a presença de EBV nas amostras de biópsia tumoral (195/198) e fluido gástrico (167/198) através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) em reações multiplex, quantificando simultaneamente o DNA viral e humano por metodologia previamente padronizada em nosso grupo <sup>44</sup>. Os oligonucleotídeos específicos e as sondas utilizadas foram: EBV (F:5'-GCAGCCGCCAGTCTCT-3'; R:5'- ACAGACAGTGCACAGGAGCCT-3'; FAM-AAAAGCTGGCGCCCTTGCCTG-TAMRA) e  $\beta$ -actina humana (F:5'-CCATCTACGAGGGGTATGC-3'; R:5'-GGTGAGGATCTTCATGAGGTA-3'; VIC-CCTGCGTCTGGACCTGGCTG-NFQ). Para execução da qPCR, foram utilizados 18  $\mu$ M dos oligonucleotídeos e 5  $\mu$ M das sondas em uma reação de 20 $\mu$ l com TaqMan Fast Universal Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific) nas plataformas Thermo Fisher Scientific: ABI 7500 Fast Real Time, StepOnePlus ou QuantStudio 7 Flex. A análise para a presença de DNA viral foi realizada pelo cálculo do  $\Delta$ Cq, onde o Cq da  $\beta$ -actina é subtraído do Cq de EBV, e o resultado calculado através da fórmula  $2^{(-\Delta Ct)}$ . As amostras foram consideradas positivas para EBV quando o valor calculado foi maior que 1, e sendo este resultado apresentado em pelo menos um tipo amostral ou em ambos (biópsia e fluido gástrico). Esta análise foi validada em trabalhos de doutoramento anterior de nosso grupo <sup>44,45</sup>.

### 3.3. Determinação do status de MSI e outras características do perfil molecular

O sequenciamento do exoma foi feito a partir de 200ng de DNA das amostras de tecido tumoral (194/198), com exceção de 04 pacientes em que foi usado o fluido gástrico, pela empresa MacroGen, através das plataformas Illumina NextSeq 4000 (100bp) e Novaseq (150bp) visando em média pelo menos 50X de cobertura. As bibliotecas foram construídas com o kit SureSelect v6 (Agilent). Os pacientes foram selecionados para sequenciamento do exoma de acordo com a disponibilidade e qualidade das amostras de tecido tumoral, incluindo critérios como ter no

mínimo de 50% de células neoplásicas na amostra e a quantidade/qualidade do DNA extraído da mesma. Os dados provenientes deste sequenciamento foram utilizados para avaliar o perfil molecular do tumor, que incluiu determinar o *status* MSI, inferir a ancestralidade genômica e ainda a análise da carga mutacional tumoral (CMT) e das assinaturas mutacionais.

As sequências obtidas foram alinhadas ao genoma humano de referência GRCh38 pelo alinhamento de *Burrows-Wheeler* utilizando a ferramenta BWA-MEM (*Maximal Exact Match*)<sup>73,74</sup>. A chamada de variantes somáticas e avaliação da qualidade dos dados do sequenciamento foi realizada de acordo com as melhores diretrizes práticas da ferramenta *Genome Analysis Toolkit 4* (GATK4) (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>). Leituras duplicadas foram removidas usando *Picard* (v2.22.8; <https://broadinstitute.github.io/picard/>), os escores base foram recalibrados e variações de nucleotídeo único (*single-nucleotide variations* - SNVs) foram chamadas através do *MuTect2* (v.4.1.7)<sup>75</sup>. Para as análises moleculares deste bloco exceto a inferência da ancestralidade, foram filtradas possíveis variantes germinativas, sendo excluídas as variantes presentes no banco AbraOM (coorte SABE609, <http://abraomib.usp.br/>). Essa metodologia foi previamente padronizada em conjunto por nosso grupo e o grupo de bioinformática do ACCCC<sup>74</sup>.

Determinamos o status MSI utilizando o software MSIseq/ NGS classifier (R Studio versão 3.1.2)<sup>76</sup>. Sendo definidos dois grupos na análise: MSI+, os casos classificados como MSI-HIGH; e MSI-, aqueles classificados como Non-MSI-HIGH.

A inferência da ancestralidade genômica predominante de cada paciente foi realizada a partir da chamada de variantes germinativas utilizando o *GATK HaplotypeCaller*<sup>77</sup> e o único filtro aplicado foi o VQSR (*Variant Quality Score Recalibration*) (R Studio versão 4.1.2). Para direcionar as análises, foram identificadas somente as variantes nas regiões de polimorfismos únicos (*single-nucleotide polymorphism* – SNPs) do banco HGDP+1000G, uma vez que somente esses SNPs são empregáveis na análise de ancestralidade. A partir do arquivo VCF gerado na análise de variantes germinativas, removendo as variantes filtradas no VQSR, foi executado o pipeline de ancestralidade, o qual converte o VCF em formato PLINK e utiliza o software Admixture, no modo supervisionado, para fazer a inferência da ancestralidade nas amostras. Esta metodologia já foi testada e previamente estabelecida em nosso grupo, também em conjunto com o grupo de bioinformática do ACCCC<sup>78</sup>.

A avaliação da carga e da assinatura mutacional dos tumores foi realizada através do programa R Studio versão 4.1.2. Para estas análises não consideramos os dados de sequenciamento a partir de amostras de fluido gástrico, apenas de amostras de tecido, devido a representação da heterogeneidade tumoral. Para determinar uma possível associação da CMT com os subtipos EBV e MSI de AdG, e com as características clínicas da coorte, avaliamos a CMT conforme previamente descrito (R Studio pacote Maftools) e além do processamento inicial mencionado acima, inicialmente foram removidos da análise 20 genes considerados “*flag genes*” (padrões pré-definidos de possíveis artefatos) <sup>79,80</sup>.

Com o mesmo intuito, a definição das assinaturas mutacionais de cada amostra foi realizada através do software Signe.R (R Studio versão 4.1.2), desenvolvido pelo grupo de Bioinformática do ACCCC <sup>79</sup>. Foram aplicados testes de distribuição e normalização dos dados, para então determinar as assinaturas ativas de cada grupo. O sentido biológico das mesmas foi avaliado segundo o banco de dados COSMIC <sup>81</sup>. Primeiro, foi realizado *fit* de assinaturas, verificando na coorte qual a exposição das assinaturas já descritas em câncer gástrico pelo banco. Para validação, refizemos a análise pelo método *de novo*, este determina o perfil de assinaturas da coorte com base nas suas exposições sem partir de uma referência específica. Posteriormente, esse novo perfil identificado foi comparado ao banco. Em seguida, analisamos a relação da CMT e das assinaturas mutacionais dos tumores com o prognóstico dos pacientes.

### 3.4. Análises estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas buscando correlacionar os achados clínico-patológicos e moleculares com o prognóstico dos pacientes. Para descrever as associações entre os marcadores estudados (EBV e MSI) e as variáveis clínicas (tabela 1) utilizamos o método de Fisher e teste Qui-quadrado através do programa SPSS versão 25. Em uma análise suplementar, as características clínicas também foram avaliadas em relação ao prognóstico pelo SPSS versão 25.

Para análise de sobrevida, foi utilizado o método de Kaplan-Meier com correção para comparação entre os grupos pelo teste de Log Rank (Mantel-Cox), ajustado no modelo semi-paramétrico, através do programa R Studio versão 4.1.2 (pacote “*survival*”). A análise foi realizada entre os grupos EBV-/+ e MSI-/, nas seguintes condições: considerando inicialmente todos os casos; excluindo casos com tratamento de intenção não-curativa (aqueles metastáticos ao diagnóstico); excluindo estes últimos e os com estadiamento TNM (7ª ed.) grau IV. Nos

tempos de 3 e 5 anos, e no tempo total. Para a sobrevida câncer específica (CE) foi utilizada a data de diagnóstico registrada na Instituição e o momento de último seguimento atualizado até 14 abril de 2022, além do status atual do paciente, entre morte por câncer (considerado o evento na análise) ou perda de seguimento/morte não relacionada ao câncer e vivo com ou sem doença. Foi considerada a sobrevida câncer específica para manter a fidelidade ao impacto da doença na sobrevida analisada, sendo somente a morte por câncer o evento válido, evitando assim o viés de outros possíveis fatores que levaram os pacientes ao óbito. Para sobrevida livre de recidiva foi usada a data de diagnóstico e o momento de registro de recidiva da doença atualizada até abril de 2022 e o status do paciente entre vivo com (evento) e sem progressão.

Ademais, analisamos uma condição em que além dos filtros mencionados acima, foram incluídos somente pacientes que realizaram cirurgia do tumor primário, a partir da data de diagnóstico a data de seguimento e o status pós-cirúrgico; nesta condição, foi considerada ainda a realização ou não de tratamento neoadjuvante.

Posteriormente, propusemos também a avaliação do prognóstico seguindo a mesma metodologia acima, porém em uma nova conformação, sendo considerados três grupos de casos: EBV+/MSI-, MSI+/EBV- e EBV-/MSI-. Levando em conta que para comparação entre 3 grupos, são avaliados 2 graus de liberdades. E excluímos dessa análise os casos com metástase ao diagnóstico. Vale ressaltar que não foi possível analisar um grupo positivo para ambos marcadores, pois somente 1 paciente teve esse perfil.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Prevalências dos subtipos AdG-EBV e AdG-MSI e características clínicas

A coorte total deste estudo incluiu 198 pacientes portadores de AdG, com média de idade de 61,5 anos. Observamos que a maioria dos pacientes se encontra na faixa etária acima de 45 anos (83,3%), são do sexo masculino (62,1%) e se identificam etnicamente como brancos (61,4%). O subtipo histológico de Lauren predominante na coorte foi o difuso, correspondendo a 96/198 (49%). O local da lesão prevalente se deu no corpo gástrico (41%); e o estadiamento clínico ao diagnóstico foi de doença localizada em 140/198 casos (72,5%), enquanto menos de 30% apresentava metástase ao diagnóstico. Quanto ao estadiamento patológico pela classificação TNM (7ª edição), a distribuição da coorte predominou entre os níveis IA e IB (33,8%). Como seguimento final dos pacientes (abril de 2022), o principal status de vida atual foi “vivo sem doença”, para 78/198 (39,4%) dos casos, enquanto óbitos por câncer ocorreram em 71/198 casos (35,9%) (tabela 1).

**Tabela 1-** Características clínicas da casuística de Adenocarcinoma Gástrico (n=198).

	AdG (n=198)	Status EBV		Status MSI	
		EBV-	EBV+	MSI-	MSI+
	n (%)	184 (92,9)	14 (7,1)	184 (92,9)	14 (7,1)
<b>Idade</b>					
≤ 45 anos	33 (16,7)	30 (16,3)	3 (21,4)	33 (17,9)	0 (0)
> 45 anos	165 (83,3)	154 (83,7)	11 (78,6)	151 (82,1)	14 (100)
<i>p value</i> <sup>a</sup>		0,708		0,133	
Média de idade (anos)	61,5	61,7	60,0	60,6	74,3
<b>Sexo</b>					
Masculino	123 (62,1)	111 (60,3)	12 (85,7)	119 (64,7)	4 (28,6)
Feminino	75 (37,9)	73 (39,7)	2 (14,3)	65 (35,3)	10 (71,4)
<i>p value</i> <sup>b</sup>		0,109		0,016*	
<b>Etnia Auto-atribuída</b>					
Pardo	39 (21,2)	37 (21,8)	2 (14,3)	35 (20,3)	4 (33,3)
Asiático	19 (10,3)	15 (8,8)	4 (28,6)	17 (9,9)	2 (16,7)
Negro	12 (6,5)	12 (7,1)	0 (0)	12 (7)	0 (0)
Branco	113 (61,4)	105 (61,8)	8 (57,1)	107 (62,2)	6 (50)
Índio	1 (0,5)	1 (0,6)	0 (0)	1 (0,6)	0 (0)
Indisponível	14	14	0	12	2
<i>p value</i> <sup>a</sup>		0,221		0,456	

**Continuação Tabela 1-** Características clínicas da casuística de Adenocarcinoma Gástrico (n=198).

<b>Classificação de Lauren</b>					
Difuso	96 (49)	88 (41,1)	8 (57,1)	94 (51,4)	2 (15,4)
Intestinal	72 (36,7)	68 (37,4)	4 (28,6)	63 (34,4)	9 (69,2)
Misto	28 (14,3)	26 (14,3)	2 (14,3)	26 (14,1)	2 (15,4)
Não classificável	2	2		1	1
	<i>p value</i> <sup>c</sup>		0,787		0,017*
<b>Estadiamento ao diagnóstico</b>					
Doença localizada	140 (72,5)	129 (72,1)	11 (78,6)	127 (70,9)	13 (92,9)
Doença metastática	53 (27,5)	50 (27,9)	3 (21,4)	52 (29,1)	1 (7,1)
Indisponível	5	5		5	
	<i>p value</i> <sup>a</sup>		0,431		0,117
<b>Local da lesão do câncer gástrico</b>					
Antro	48 (25)	46 (25,4)	2 (14,3)	38 (20,8)	10 (83,3)
Boca Anastomótica	8 (4)	7 (3,9)	2 (14,3)	9 (4,9)	0 (0)
Cardia / Fundo	32 (16)	29 (16)	3 (21,4)	31 (16,9)	1 (8,3)
Corpo	79 (41)	74 (40,9)	5 (35,7)	79 (40,5)	0 (0)
Esôfago Distal	24 (12)	23 (12,7)	1 (7,1)	23 (12,6)	1 (8,3)
Linite	3 (2)	2 (1,1)	1 (7,1)	3 (1,6)	0 (0)
Indisponível	3	3		1	2
	<i>p value</i> <sup>a</sup>		0,159		0,0004**
<b>Presença de <i>Helicobacter pylori</i></b>					
Negativo	129 (81,6)	120 (82,5)	9 (69,2)	121 (81,2)	8 (88,9)
Positivo	29 (18,4)	25 (17,2)	4 (30,8)	28 (18,8)	1 (11,1)
Indisponível	40	39	1	35	5
	<i>p value</i> <sup>a</sup>		0,260		1,000
<b>Cirurgia laparoscopia estadiadora</b>					
Sim	108 (56,8)	99 (56,3)	9 (64,3)	105 (59,3)	3 (23,1)
Não	82 (43,2)	77 (43,8)	5 (35,7)	72 (40,7)	10 (76,9)
Indisponível	8	8		7	1
	<i>p value</i> <sup>b</sup>		0,761		0,024*
<b>Cirurgia do tumor primário</b>					
Sim	139 (70,2)	129 (70,5)	10 (71,4)	128 (69,9)	11 (78,6)
Não	58 (29,3)	54 (29,5)	4 (28,6)	55 (30,1)	3 (21,4)
Indisponível	1	1		1	
	<i>p value</i> <sup>a</sup>		1,000		0,762
<b>Tratamento neoadjuvante</b>					
Sim	100 (51,3)	91 (50,3)	9 (64,3)	95 (52,5)	4 (28,6)
Não	95 (48,7)	90 (49,7)	5 (35,7)	86 (47,5)	10 (71,4)
Indisponível	3	3		3	
	<i>p value</i> <sup>a</sup>		0,440		0,148
<b>Tratamento Adjuvante</b>					
Sim	79 (39,9)	73 (40,3)	6 (42,9)	77 (42,5)	2 (14,3)
Não	116 (58,6)	108 (59,7)	8 (57,1)	104 (57,5)	12 (85,7)
Indisponível	3	3			
	<i>p value</i> <sup>c</sup>		1,000		0,073

**Continuação Tabela 1-** Características clínicas da casuística de Adenocarcinoma Gástrico (n=198).

<b>Estadiamento TNM Agrupado (7<sup>a</sup>)</b>					
I (A e B)	46 (33,8)	43 (34,1)	3 (30)	44 (34,9)	2 (20)
II (A e B)	32 (23,5)	29 (23)	3 (30)	28 (22,2)	4 (40)
III (A, B e C)	38 (27,9)	36 (28,6)	2 (20)	35 (27,8)	3 (30)
IV	11 (8,1)	11 (8,7)	0 (0)	10 (7,9)	1 (10)
Resposta completa	9 (6,6)	7 (5,6)	2 (20)	9 (7,1)	0 (0)
Indisponível	62	58	4	58	4
<i>p value<sup>b</sup></i>		0,394		0,632	
<b>Último seguimento</b>					
Óbito por câncer	71 (35,9)	71 (38,6)	4 (28,6)	71 (38,6)	4 (28,6)
Óbito não câncer	11 (5,6)	11 (5,9)	0 (0)	7 (3,8)	4 (28,6)
Vivo com doença	38 (19,2)	34 (18,4)	0 (0)	33 (17,9)	1 (7,14)
Vivo sem doença	78 (39,4)	68 (36,9)	10 (71,4)	73 (39,7)	5 (35,7)
Perda de seguimento	44	41	3	38	6
<i>p value<sup>a</sup></i>		0,065		0,013*	

Legenda: AdG: Adenocarcinoma Gástrico. EBV: vírus de Epstein-Barr; EBV-: DNA viral não detectado, EBV+: DNA viral detectado. O status EBV foi avaliado em amostras gástricas por qPCR. MSI: instabilidade de microssatélites; MSI+: instabilidade de microssatélites alta, MSI-: instabilidade de microssatélites baixa/negativa. O status MSI foi avaliado em amostras tumorais por sequenciamento de exoma. Indisponível: sem informação no prontuário médico ou dado não aplicável a variável. Não classificável: material indiferenciável. Dados indisponíveis, não aplicáveis ou não classificáveis foram omitidos na análise estatística. Testes estatísticos empregados: *a*-Exato de Fisher; *b*-Correção de continuidade; *c*-Qui-quadrado de Pearson. Em vermelho, estão indicados os valores de *p* quando inferiores a 0,05 (\*) ou inferiores a 0,01(\*\*).

Nossas análises indicaram a mesma prevalência de 7,1% para EBV+ e MSI+ (14/198 para ambos) entre os participantes do estudo (tabela 1). Um único caso se mostrou positivo para os dois marcadores (EBV e MSI), achado este que reforça sugestões da literatura que indicam que em geral estes dois subtipos de AdG são mutuamente exclusivos<sup>11,14-16</sup>. Deste modo, os pacientes foram classificados em quatro grupos:

- i) EBV-: 184 pacientes (92,9%)
- ii) EBV+ (AdG-EBV): 14 pacientes (7,1%)
- iii) MSI-: 184 pacientes (92,9%)
- iv) MSI+ (AdG-MSI): 14 pacientes (7,1%)

Os 14 pacientes EBV+ apresentaram idade média de 60 anos (78,6% > 45 anos; p=0,708) e em sua maioria foram do sexo masculino (85,7%; p=0,109). Enquanto os 14 casos MSI+ apresentaram idade mais elevada (média 74,3 anos e nenhum caso ≤ 45 anos; p=0,133), os mesmos foram principalmente do sexo feminino (71,4 %; p=0,016), inclusive apresentando

relação significativa. Em conformidade, na coorte do TCGA (2014), a média de idade e o sexo predominante para EBV+ e MSI+, foi respectivamente, de 59 anos e 81% masculino; 72 anos e 56% feminino <sup>11</sup>. Em relação ao local da lesão do AdG, para os casos EBV+, em maioria se apresentou no corpo (35,7%; p=0,159), e para os MSI+, de forma significativa, no antro gástrico (83,3%; p<0,0). Quanto à classificação histológica de Lauren, a distribuição dos casos EBV+ e MSI+, foi respectivamente equivalente a 28,6% e 69,2% no subtipo intestinal; 57,1% e 15,4% no subtipo difuso; e 14,3% e 15,4% no subtipo misto (além de um paciente MSI+ com subtipo não classificável) (tabela 1). Observamos uma relação significativa entre o status MSI e esta classificação histológica (p=0,017), enquanto em relação à presença de EBV o mesmo não foi observado. Apesar deste grupo também ser relacionado a histologia intestinal, a maioria dos casos EBV+ foram classificados como subtipo difuso, o que poderia refletir um efeito da proporção de casos negativos vs positivos na casuística. Entretanto, o AdG-EBV também foi correlacionado ao subtipo difuso em uma recente revisão sistemática que avaliou mais de 220 estudos, incluindo mais de 68mil casos de AdG, onde 7,5% eram EBV+ (95% IC: 6,9-8,1), dados estes alinhados com o que vimos neste trabalho <sup>82</sup>.

As características clínico-patológicas descritas na nossa coorte e suas frequências (tabela 1) se mostraram em concordância com o observado mundialmente para os dois subtipos moleculares investigados. Essas frequências apresentam variabilidade, tanto em trabalhos recentes como antigos, sendo em média <10% para EBV+ e 7-25% para MSI+ <sup>11,13,14,16,18,26,31,82,83</sup>. Ainda, neste trabalho, enfrentamos limitações similares àquelas observadas por outros autores, como um pequeno grupo de casos positivos para EBV e MSI, o que impacta em outras análises decorrentes desta, como a avaliação prognóstica <sup>14,16</sup>.

Saito et al. (2021) indicaram a prevalência de EBV+ de 6,7%, sendo 27/401 casos de AdG em uma coorte japonesa <sup>14</sup>. A nossa coorte, composta por quase duzentos casos, também mostrou uma prevalência abaixo de 10%, assim como a coorte investigada pelo TCGA (2014), que compreendeu 295 casos sendo 9% EBV+ <sup>11</sup>. Uma meta-análise referenciada por este mesmo estudo do TCGA, reuniu dados de 70 trabalhos publicados de 1992 a 2008 com coortes com 19 até 2.966 pacientes de diferentes origens geográficas, onde foi apontada a prevalência de AdG-EBV de 8,7% (95% CI: 7.5%–10.0%), sendo similar entre os pacientes da Ásia (8,3%), Europa (9,3%) e Américas (9,9%) <sup>11,83</sup>.

A distribuição geográfica também é uma questão importante levantada na literatura sobre a classificação molecular dos tumores AdG-MSI. Puliga et al. (2021), ressaltam o impacto da

heterogeneidade das coortes avaliadas em função da frequência observada de tumores MSI+, tanto pela reduzida representatividade étnica, como pela falta de heterogeneidade nas características clínicas dos pacientes das coortes estudadas, fatores estes que afetam as análises estatísticas e as conclusões dos estudos <sup>26</sup>. Neste sentido, os pacientes avaliados pelo TCGA (2014) eram em sua maioria asiáticos ou brancos, com um pequeno número de negros e nenhum hispânico. No entanto, é sabido que o CG é mais frequente em hispânicos/latinos do que em brancos não-hispânicos, um aspecto relevante a ser considerado na população de estudo. Outros fatores como o estágio tumoral, que tem prevalência de MSI+ baixa (<5%) em casos metastáticos e mais alta (~20%) em casos com doença nódulo-negativa, também precisam ter seu impacto considerado nas coortes estudadas <sup>11</sup>. Ainda, interessante, outros autores apontam que pode haver variação da positividade para MSI dentro da mesma amostra tumoral dependendo da área tumoral avaliada <sup>26</sup>. Mathiak et al. (2017), indicaram a prevalência de 7,5% MSI+ (34/452) e identificaram um perfil de expressão bifásica de MSH2 (avaliado por imunohistoquímica), com áreas do mesmo tumor com positividade de 85% para MSI e também com microssatélites estáveis (MSS) entre 5 a 23% <sup>26,84</sup>.

Outro fator crucial que é associado a estas discrepâncias na literatura para o AdG-EBV e AdG-MSI é a metodologia empregada em cada estudo. O método mais tradicional e padrão para determinar a presença de EBV é a hibridização *in situ* (ISH), que detecta a presença dos EBERs 1 e 2 e micro-RNAs de EBV nas amostras de AdG <sup>11,84</sup>. Essa é uma metodologia que apesar de mais comum, é mais trabalhosa e quando automatizada se torna mais custosa. Atualmente, diversos autores têm utilizado técnicas moleculares para avaliar a presença de EBV. Um estudo que compreendeu 760 casos de AdG, determinou a prevalência de EBV+ de 4,2% nas biópsias avaliadas (6/143) e de 3,9% em amostras de peças cirúrgicas (24/617). Estes autores usaram técnica de qPCR, tendo como alvo as regiões BamH1-K e BamH1-W do genoma de EBV, e os casos positivos foram então analisados por ISH para validar a positividade de EBV <sup>16</sup>. No presente trabalho, também avaliamos a presença de EBV por qPCR, usando além de amostras de biópsia, amostras de fluido gástrico, e observamos uma frequência similar entre os tipos amostrais. Para 165/198 pacientes, avaliamos a presença de EBV em amostras pareadas de tecido e fluido gástrico, com 14 casos EBV+ no total, dos quais 11 foram positivos em amostras de tecido (79%) e 9 em fluido gástrico (64%), com concordância em 6/14 casos (43%), sendo positivos em ambos os tipos amostrais. No entanto, não foi possível avaliar uma comparação estatística entre os tipos de amostra e seus respectivos resultados devido a indisponibilidade de pareamento para grande parte da coorte, principalmente pela ausência da coleta de fluido

gástrico de casos mais antigos de nosso estudo (para 31 casos não havia coleta de fluido gástrico, e quanto a amostra tecidual, a indisponibilidade foi de 3 casos).

Recentemente, Stanek et al. (2022) avaliaram 40 pacientes com AdG, dos quais 9 foram EBV+, utilizando um kit comercial específico de qPCR para detecção de EBV. Este resultado relatou uma frequência bem acima da média para o AdG-EBV, e os próprios autores indagaram ser um possível artefato ou eventualidade, não sendo passível de comparação devido a coorte pequena<sup>54</sup>. Por outro lado, o estudo do TCGA (2014), que definiu o AdG-EBV de fato como um subtipo molecular, não empregou qPCR ou o método padrão de ISH, e sim realizou um compilado entre vários métodos de NGS, tais como o sequenciamento de exoma, do genoma completo (WES) e de mRNA e miRNA (RNAseq), que apresentaram resultados altamente concordantes<sup>11</sup>. Ademais, esses dados de RNAseq do banco TCGA-STAD (375 tumores e 32 amostras não-tumorais), foram por sua vez reanalisados por Sadato et al. (2019), que propuseram um novo *pipeline* de análise bioinformática indicando que 49,6% dos casos reanalisados poderiam ser EBV+. Entretanto, o RNAseq requer uma análise mais complexa que o sequenciamento de exoma, por exemplo. E embora talvez fosse possível demonstrar de modo mais acurado a prevalência de EBV, isso implicaria em custos significativamente maiores. Dessa maneira, foi sugerido que a prevalência de EBV pode ser bastante variável e certamente é afetada pelo método de análise<sup>85</sup>.

Ainda nesta linha, a variação de métodos empregados e de frequências observadas no AdG-MSI é até mais marcante. Há duas metodologias mais comumente utilizadas, a imunohistoquímica (IHQ) que avalia a expressão das proteínas envolvidas no sistema MMR e o método molecular por PCR/eletroforese capilar, que inclui a avaliação de 5 marcadores, geralmente 2 mononucleotídeos e 3 dinucleotídeos ou a identificação de 5 mononucleotídeos de repetição *poly-A*. A IHQ representaria o método de primeira linha no diagnóstico do AdG-MSI devido a sua maior facilidade, enquanto a metodologia da PCR foi padronizada pelo NCI (*National Cancer Institute*, USA), se tornando referência, o conhecido *Bethesda Panel*<sup>(26)</sup>. Por mais de vinte anos, esse painel tem sido o método padrão ouro para determinação da MSI em vários tipos tumorais, como o colorretal, por exemplo. Ao longo do tempo, houve uma evolução das técnicas moleculares usadas para determinação da MSI, passando por diversas variações de PCR, até chegar nos métodos atuais de NGS<sup>17</sup>.

O ponto chave para avaliação da MSI é a escolha dos marcadores usados, que pelo painel padrão tem um número limitante, enquanto o maior diferencial da metodologia NGS é expandir o

número de marcadores, além de reduzir o limite de detecção chegando a 1% e permitindo a inclusão de mais de 100 marcadores a depender do protocolo utilizado<sup>17</sup>. Além da PCR requerer o pareamento com uma amostra normal (não-tumoral) do paciente para análise, o que por NGS não é mandatório. Portanto, mesmo o NGS sendo uma metodologia mais cara, diversos autores vêm empregando-a na determinação da MSI no AdG, já que os dados podem ser obtidos a partir de análises complementares, resultantes de painéis gênicos ou exomas<sup>54</sup>. Como prova de conceito, um estudo realizou a análise de MSI por *ultra-deep sequencing* e pelo painel de Bethesda, onde os cinco marcadores padrão foram sequenciados com coberturas de 5.000-8.000X, e obtiveram resultados semelhantes ao método por PCR, demonstrando que a metodologia NGS é eficiente e confiável quando usada para este fim<sup>17</sup>. O estudo do TCGA (2014) também fez a classificação do AdG-MSI através de WES e, mesmo considerando regiões com baixa cobertura (~6X), obtiveram uma prevalência de 22% de MSI+ ao avaliarem 107 tumores e amostras não-tumorais pareadas<sup>11</sup>. Também, Zhou et al. (2022) determinaram o status de EBV e de MSI por NGS em uma coorte de 1.688 casos de CG distribuída em grupos de idade (>45 anos e <45 anos), onde as frequências foram similares entre os grupos observados<sup>86</sup>.

Nesse momento, vale aqui então entender como o NGS sendo mais caro e complexo tem sido mais aplicado atualmente. Além da extrapolação dos marcadores utilizados e de ter uma sensibilidade potencialmente maior (a depender da profundidade do sequenciamento), os dados provenientes do NGS permitem diversas análises moleculares a partir do mesmo resultado, o que ocorre em vários estudos, incluindo o presente trabalho<sup>17</sup>. Ademais, métodos eficientes de análise de dados têm sido desenvolvidos para suprir tal demanda. Baudrin et al. (2018), descrevem 13 *softwares* que podem ser usados para análise de MSI, quando se tem ou não amostra não-tumoral pareada. Os primeiros artigos usaram dados de comparação da distribuição de comprimento repetido de microssatélites, como o MSIsensor, mSINGs, MANTIS, método Cortes-Ciriano e MSI-ColonCore. Os mais recentes são baseados na análise de carga total de mutação em todas as sequências e/ou a carga de *indels* nos microssatélites, incluindo MSIseq Index, MSIseq/NGS classifier e Nowak<sup>17</sup>.

Neste trabalho, determinamos os status de MSI através da análise de exoma. Foram sequenciadas em média acima de 95 milhões de pares de bases, com média de alinhamento de 99% ao genoma humano. Em média, 98% das regiões exônicas sequenciadas de todas as amostras tiveram cobertura vertical acima de 10X, 93% acima de 20X e 73% acima de 50X. Para então avaliar o status de MSI empregamos o software *MSIseq/NGS classifier*. Este

software foi estruturado através de quatro *machine-learning frameworks* (regressão logística, árvore de decisão, *random forest* e *naive Bayes*) e utiliza dados de sequenciamento (mutações somáticas), não requerendo o pareamento com amostras não-tumorais (que indicariam o status de mutações germinativas). O *software* usa a taxa e a razão das pequenas substituições de nucleotídeos em todas as sequências, e os *indels* de microssatélites de repetição de mono a tetranucleotídeo, para classificar as amostras em “MSI+” (MSI-High) e “MSI-” (non-MSI-High). Isso provê os melhores resultados com o classificador de árvore de decisão, e na testagem de validação do MSIseq/NGS classifier que contou com 163 tumores, foi alcançada uma concordância de 98% em relação aos testes clínicos <sup>17,76</sup>.

Quanto a outras características da coorte, também avaliamos para os casos com testagem de rotina disponível, a presença de *Helicobacter pylori* (Hp), que foi em sua maioria negativa tanto para os casos EBV+ (69,2%; p=0,260) quanto para os MSI+ (88,9%; p=1,0), e também nos casos negativos para os marcadores (EBV- 82,5%; MSI- 81,2%) (tabela 1). A princípio, este pode ser um dado que cause impressão controversa, porém na coorte do TCGA (2014) também foi observada apenas evidência esporádica de Hp, o que pode refletir nestes casos que haja um declínio na presença desta bactéria a medida que ocorre a progressão de uma gastrite crônica para a neoplasia <sup>11</sup>. No entanto, não encontramos dados disponíveis de presença de Hp em 40 casos da nossa coorte. Tanto EBV quanto Hp são classificados como carcinógenos tipo I pela OMS. A infecção por estes patógenos pode gerar uma inflamação crônica que por sua vez contribui para o desenvolvimento do câncer <sup>87</sup>. Rihane et al. (2021), avaliaram o cenário da co-infecção destes dois patógenos no CG, encontrando-a em 16/100 casos e sugeriram uma possível associação com a idade dos pacientes, relacionando a casos mais jovens (<58 anos) <sup>87</sup>. Este estudo empregou uma técnica pouco utilizada para determinar o status EBV, obtendo uma frequência incomum e bastante elevada (40%), e os grupos de idade foram separados em uma faixa um pouco acima do que é geralmente usado em coortes maiores na literatura (geralmente  $\leq 45$ ) <sup>11,16,86</sup>. Os autores indicaram que a co-infecção contribuiu para promoção da malignidade nos tecidos e maior agressividade da doença, corroborando a teoria de que os dois agentes podem estimular um microambiente pró-inflamatório e se beneficiarem mutuamente <sup>87,88</sup>. No entanto, o AdG-EBV, per si, já vem sendo relacionado a uma idade mais jovem, enquanto o AdG-MSI a uma idade mais avançada <sup>38,54</sup>. Nesse sentido, é válido considerar outros fatores decorrentes dessas associações. Por exemplo, pacientes mais jovens apresentam em maior frequência metástases ao diagnóstico comparado a pacientes mais velhos, mesmo que sejam de subtipos com melhor prognóstico como o AdG-EBV ou AdG-MSI <sup>13,38</sup>.

Nossos resultados apontaram que ambos os grupos, AdG-EBV e AdG-MSI, apresentaram o estadiamento do câncer ao diagnóstico em sua maioria ainda como doença localizada (EBV+ 78,6% vs EBV- 72,1%;  $p=0,431$  e MSI+ 92,9% vs MSI- 70,9%;  $p=0,117$ ). Ambos foram classificados pelo TNM (7ª edição) principalmente em níveis iniciais (I e II), com apenas 01 paciente MSI+ se apresentando com grau IV e nenhum paciente EBV+. Apesar de alguns casos com perda de seguimento atual, 10/14 casos EBV+ (71,4%;  $p=0,065$ ) e 5/14 dos MSI+ (35,7%;  $p=0,013$ ) apresentaram status de vida como “vivo sem doença” até o último seguimento avaliado em abril de 2022 (casos diagnosticados desde 2000 a 2020, mediana de tempo de seguimento de 50 meses), demonstrando uma possível relação significativa entre estas variáveis (tabela 1). Estes resultados inicialmente mostraram uma boa perspectiva para os casos positivos, que em seguida tiveram o impacto prognóstico dos marcadores investigados avaliado pela tendência de sobrevida, alinhados ao perfil clínico-patológico destes subtipos como reportado na literatura <sup>(14,20)</sup>. Quanto à realização de intervenções cirúrgicas, 76,9% dos casos MSI+ fizeram laparoscopia estadiadora ( $p=0,024$ ). Já em relação à cirurgia do tumor primário, a maioria dos casos positivos dos dois grupos a realizaram. Tanto para os tratamentos neoadjuvante (EBV,  $p=0,440$ ; MSI,  $p=0,148$ ) quanto adjuvante (EBV,  $p=1$ ; MSI,  $p=0,073$ ), a distribuição dos casos não demonstrou relação significativa. Em uma análise preliminar observamos impacto positivo da realização de cirurgia e dos dois tratamentos na sobrevida de modo geral da coorte. Essas estratégias terapêuticas geralmente apresentam resultado aceitável por um período de tempo, tanto no CG quanto para a maioria dos tipos de neoplasia, porém, podem ter impacto considerável na qualidade de vida dos pacientes. Um dos maiores desafios clínicos e científicos atuais é proporcionar um melhor tratamento aos pacientes, que seja eficaz e menos penoso. Por isso, esforços têm sido empregados para determinar biomarcadores que auxiliem a definição da conduta terapêutica mais adequada e com maior chance de êxito <sup>12</sup>.

#### **4.2. Avaliação do impacto prognóstico da presença de EBV e MSI no AdG**

A ocorrência de infecção por EBV ou da instabilidade de microsátélites no AdG tem sido investigada e geralmente correlacionada com a resposta a diferentes regimes de quimio e imunoterapia <sup>12,26,55</sup>. No Brasil, poucos estudos foram feitos visando compreender a relação entre estes marcadores e o desfecho da doença <sup>28</sup>. Neste trabalho, analisamos a sobrevida câncer específica (CE) e livre de recidiva em 198 casos de AdGs, buscando correlacionar estes marcadores com o prognóstico dos pacientes. Visando reduzir a influência de possíveis fatores

de confusão nas análises, desconsideramos os pacientes que realizaram tratamento sem intenção curativa (aqueles com tumores já metastáticos ao diagnóstico) (condição A), além de casos com estadiamento TNM (7ª ed.) grau IV e/ou casos em que a classificação TNM não se aplicava (ou seja, não realizaram cirurgia) (condição B), uma vez que, nestas circunstâncias o prognóstico é diretamente impactado/enviesado pela própria agressividade da doença ao diagnóstico - efeito este observado em análise suplementar de nosso estudo. Dessa maneira, realizamos as análises de sobrevida considerando somente os pacientes que não se enquadraram nos critérios A e B, com 03 e 05 anos de acompanhamento, e obtivemos resultados muito semelhantes (Kaplan–Meier). Então, por ser o mais comumente encontrado na literatura <sup>89,90</sup>, consideramos o tempo de 05 anos para avaliação de sobrevida dos pacientes AdG-EBV e AdG-MSI. Vale ressaltar aqui que não foi possível estimar o valor de tempo médio de sobrevidas devido às perdas de seguimento. Quando há perdas de seguimento de muitos pacientes, a curva de sobrevida obtida pelo método de Kaplan-Meier para a população avaliada não decai o suficiente para alcançar o valor de 0.5. Este ponto que indicaria a sobrevida mediana da coorte, porém nos nossos casos ele não foi atingido dentro da janela de observação. Desta forma, os dados permitem apenas avaliar a tendência de sobrevidas e sua relação estatística entre os grupos.

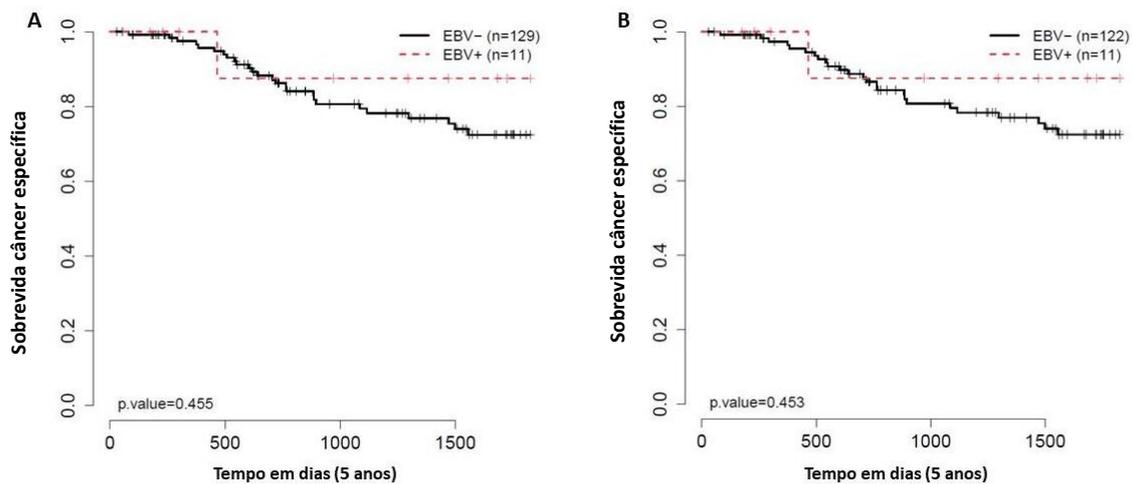
No AdG-EBV, os casos EBV+ apresentaram tendência de sobrevida CE semelhante, sendo apenas um pouco maior em relação aos EBV-, tanto na condição A como na B ( $p^A=0,455/ p^B=0,453$ ) (figura 2). Para sobrevida livre de recidiva nas duas condições, os casos positivos apresentam tendência de sobrevida maior que os negativos ( $p^A=0,124/ p^B= 0,149$ ), e nenhum paciente EBV+ apresentou recidiva da doença em 5 anos (figura 3). Enquanto no AdG-MSI, nas condições A e B, para sobrevida CE, os casos MSI+, apresentaram uma tendência menor ( $p^A=0,17/ p^B=0,141$ ) (figura 4), e para sobrevida livre de recidiva a tendência foi semelhante entre os casos MSI+ e MSI- ( $p^A=0,383/ p^B= 0,24$ ) (figura 5). No entanto, não houve diferença significativa na avaliação entre os grupos positivos e negativos para ambos marcadores, o que possivelmente reflete uma limitação decorrente do tamanho da coorte e do pequeno número de casos positivos para os marcadores. Assim como outros autores observaram, mesmo em estudos com coortes maiores que a nossa, poucos são os casos positivos, o que invariavelmente impacta nas demais análises <sup>16,20,48</sup>. As taxas de risco (do inglês: *Hazard Ratio*- HR) associadas aos grupos EBV+ e MSI+ também foram avaliadas para ocorrência de morte e recidiva da doença em todas as condições de análise (quadro 1), onde todos os intervalos encontrados englobam o

valor de 1, impossibilitando assim a afirmação de um papel dos marcadores no risco de eventos avaliados.

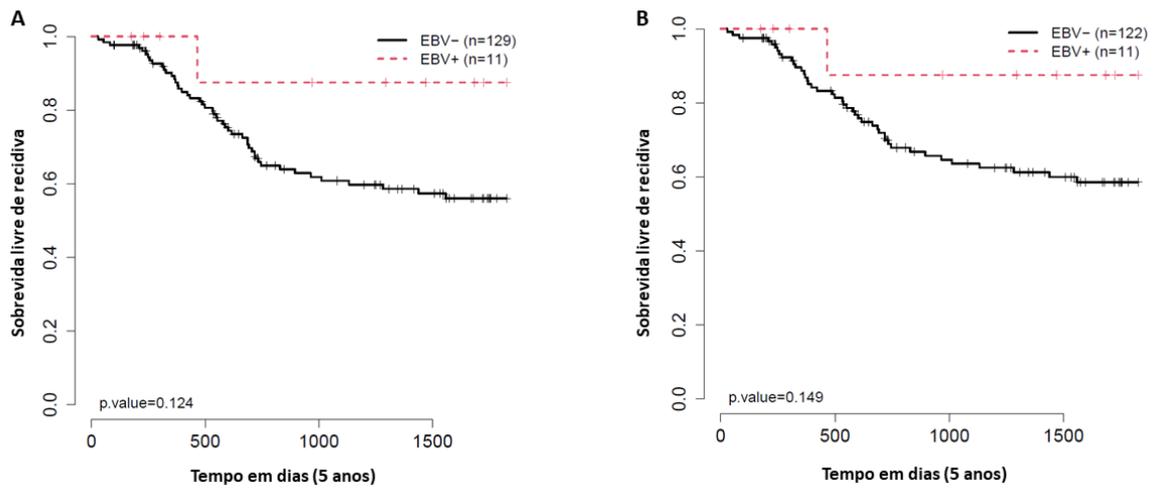
**Quadro 1-** Taxas de risco associadas aos grupos EBV+ e MSI+ para sobrevidas câncer específica e livre de recidiva (5 anos).

	Sobrevida Câncer específica (5 anos)				Sobrevida Livre de recidiva (5 anos)			
	AdG-EBV		AdG-MSI		AdG-EBV		AdG-MSI	
	Condição A	Condição B	Condição A	Condição B	Condição A	Condição B	Condição A	Condição B
<b>HR</b>	0,4231	0,4087	2,334	2,6738	0,2206	0,2248	1,5135	1,832
<b>IC 95%</b>	0,056 – 3,215	0,053 – 3,129	0,692 - 7,869	0,785 - 9,107	0,03 – 1,626	0,03 – 1,669	0,54 - 4,245	0,648 – 5, 179
<b>p value</b>	0,406	0,389	0,172	0,116	0,138	0,144	0,431	0,253

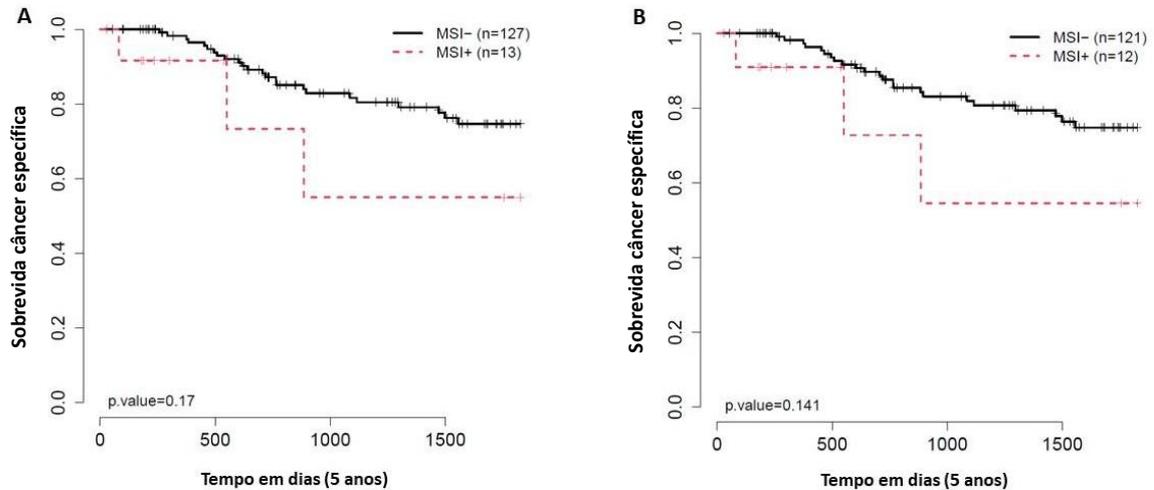
Legenda: HR: *Hazard Ratio* (taxa de risco), IC: intervalo de confiança de 95%.



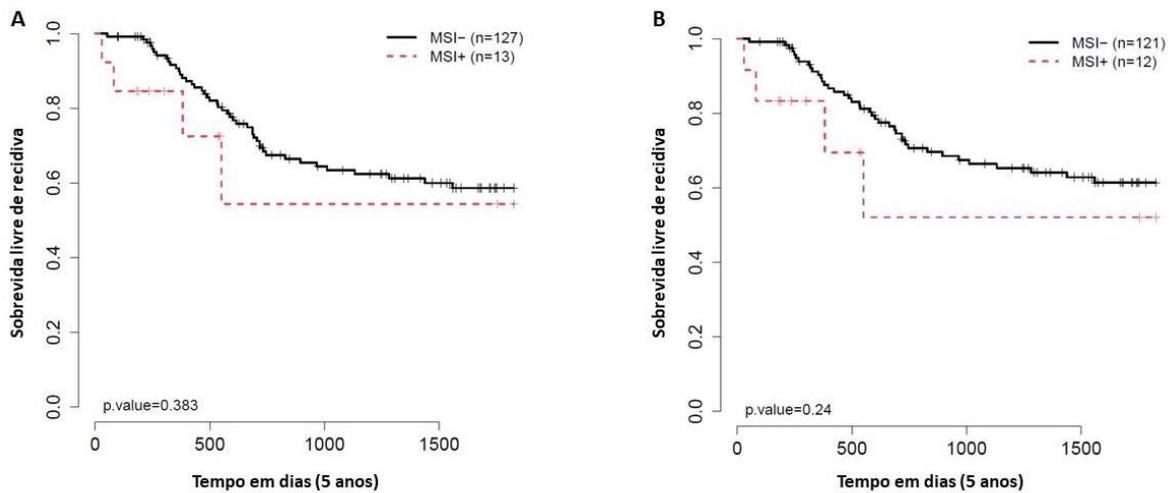
**Figura 2-** Tendência de sobrevida câncer específica em 5 anos no AdG-EBV. (A). Condição de análise A (excluídos casos de metástase ao diagnóstico). (B). Condição de análise B (excluídos casos de metástase ao diagnóstico & casos TNM 7<sup>a</sup> ed. grau IV).



**Figura 3-** Tendência de sobrevida livre de recidiva em 5 anos no AdG-EBV. (A). Condição de análise A (excluídos casos de metástase ao diagnóstico). (B). Condição de análise B (excluídos casos de metástase ao diagnóstico & casos TNM 7<sup>a</sup> ed. grau IV).



**Figura 4-** Tendência de sobrevida câncer específica em 5 anos no AdG-MSI. (A). Condição de análise A (excluídos casos de metástase ao diagnóstico). (B). Condição de análise B (excluídos casos de metástase ao diagnóstico & casos TNM 7<sup>a</sup> ed. grau IV).

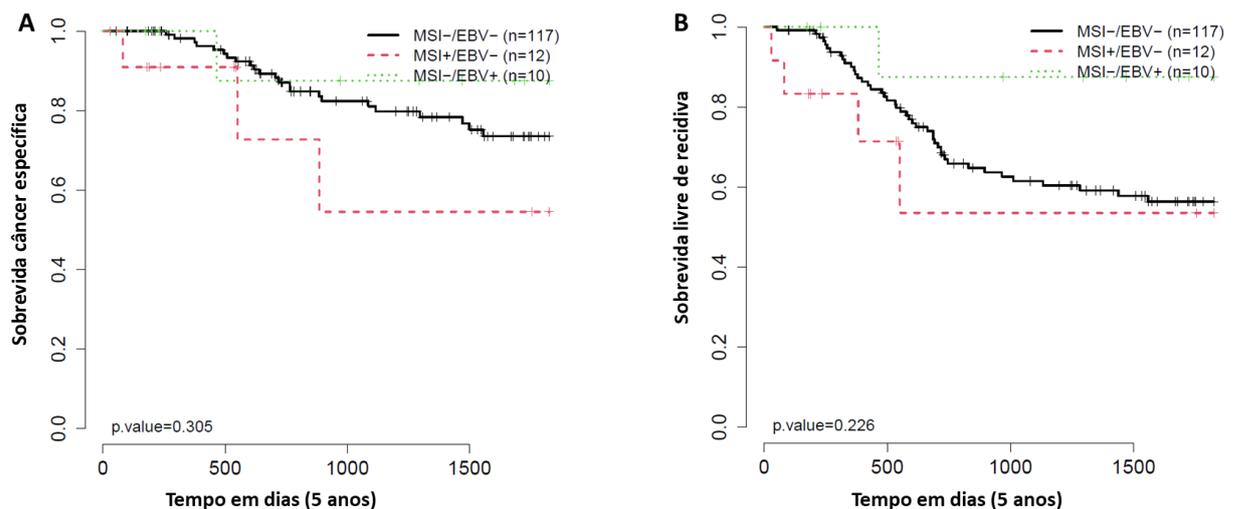


**Figura 5-** Tendência de sobrevida livre de recidiva em 5 anos no AdG-MSI. (A). Condição de análise A (excluídos casos de metástase ao diagnóstico). (B). Condição de análise B (excluídos casos de metástase ao diagnóstico & casos TNM 7<sup>a</sup> ed. grau IV).

A nossa coorte apresenta um bom número de casos, e com frequência dos marcadores investigados de acordo com o reportado em outros estudos <sup>11,18,26,82</sup>, onde o valor prognóstico destes subtipos moleculares têm em geral sido correlacionado a melhores resultados <sup>12,14,16</sup>. Neste trabalho, observamos uma sobrevida câncer específica e livre de recidiva mais favorável para casos EBV+ quando comparadas aos casos EBV-. Sugerindo um possível valor prognóstico da presença de EBV quanto a ocorrência de recidivas. No entanto, diferentemente do observado na literatura, não observamos um melhor prognóstico nos casos MSI+, os quais tiveram comportamento semelhante aos MSI-, ou mesmo com tendência de sobrevida menor. O AdG-MSI é mais comum em pacientes de idade mais avançada, o que também observamos em nossa coorte, e pode impactar em outros fatores clínicos que afetariam a avaliação do prognóstico <sup>11,84</sup>. Aqui, ainda consideramos que os casos com doença metastática ao diagnóstico e TNM IV, apesar de serem poucos nos grupos positivos para os marcadores, também poderiam influenciar esta avaliação, sendo então filtrados como mencionado anteriormente. Puliga et al (2021), inclusive menciona que fatores como o estadiamento, entre outros aspectos da doença, devem ser levados em conta ao estudarmos o AdG-MSI <sup>26</sup>.

Kohlruss et al (2019) observaram a partir de amostras de ressecção tumoral (sem realização de QTneo), que os pacientes com positividade para EBV apresentaram uma tendência de maior sobrevida global (p=0,181; HR [0,04;1,87]), seguido dos pacientes MSI+ (apenas MSI-H neste grupo) (p=0,465; HR [0,45;1,44]), sendo um resultado melhor quando comparado aos pacientes

com MSI baixa; e MSI estável/negativos para EBV <sup>16</sup>. Este estudo, que teve uma coorte de mais de 700 casos e destrinchou suas avaliações com base nos tipos de tratamento realizados, comparou os casos negativos como um grupo único em relação aos casos positivos para EBV ou MSI. Buscando entender melhor a relação dos marcadores e o prognóstico da nossa coorte, analisamos de uma nova maneira, diferenciando os 198 pacientes de AdG agora em três grupos: MSI-/EBV- (n=117), MSI-/EBV+ (n=10) e MSI+/EBV- (n=12). Aqui foi desconsiderado 1 caso positivo para os dois marcadores, que seria inviável analisar, e foram excluídos casos de metástase ao diagnóstico, sendo aplicado o mesmo conceito da condição A da análise anterior. Neste cenário, pudemos comparar os casos positivos e negativos sem sobreposição da presença dos marcadores. Observamos que os casos positivos para EBV (MSI-/EBV+) permanecem demonstrando tendências de sobrevida CE (p=0,305) e livre de recidiva (p=0,226) mais favoráveis quando comparados aos casos duplamente negativos (EBV-/MSI-), e também em relação aos casos positivos para MSI (MSI+/EBV-), que por sua vez ainda demonstraram tendências de sobrevida menos favoráveis. No entanto, também não observamos diferença com significado estatístico para o prognóstico entre os grupos nessa conformação e não foi possível afirmar relação através das taxas de risco (figura 6).



**Figura 6-** Tendência de (A) sobrevida câncer específica (CE) e (B) livre de recidiva em 5 anos no AdG-MSI e AdG-EBV considerando três grupos de análise: MSI-/EBV-; MSI-/EBV+; MSI+/EBV-. Grupo MSI+/EBV-, na sobrevida CE, HR: 2,3674 [0,701; 7,991], p= 0,165, e na sobrevida livre de recidiva, HR: 1,5256 [0,544; 4,28], p= 0,422. Grupo MSI-/EBV+, na sobrevida CE, HR: 0.4398 [0.058; 3.337], p= 0,427; e na sobrevida livre de recidiva, HR: 0,2273 [0,031; 1,674], p= 0,146.

Um trabalho brasileiro do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP-HCFMUSP) avaliou as características clínicas e o prognóstico de uma coorte de 287 casos de AdG (2009-2016) que realizaram gastrectomia curativa, e não incluiu casos metastáticos ao diagnóstico<sup>91</sup>. Neste estudo foi investigada a presença de EBV por ISH, e MSI e PD-L1 por IHQ, identificando prevalências de EBV e MSI de 10,5% e 27%, respectivamente. A positividade para PD-L1 foi observada em 8,8% dos casos, de modo predominante dentre os pacientes EBV+ ( $p < 0,001$ ). Quanto ao prognóstico, avaliaram os casos divididos em três grupos, no mesmo formato mencionado acima. Os pacientes MSI+ foram os que apresentaram melhores taxas de sobrevida CE em 5 anos ( $p = 0,049$ ) e livre de recidiva em 3 anos ( $p = 0,006$ ) quando comparados aos casos EBV-/MSI-, enquanto os casos EBV+ apresentaram resultados semelhantes ao grupo negativo. Também foi avaliado o prognóstico comparando os casos PD-L1 positivos e negativos, onde o resultado também foi semelhante entre os mesmos, porém não compararam entre os subgrupos EBV+ ou MSI+ e a presença de PD-L1<sup>91</sup>.

O panorama do prognóstico para coorte deste estudo se mostrou inverso ao observado no presente trabalho. Justamente, os nossos casos MSI+ mostraram sobrevida menos favorável, entretanto, a prevalência deste marcador na nossa coorte foi de 7,1% contra 27% no estudo do ICESP, estando ambas nos extremos da variação da literatura (7-25%) e foi utilizada uma metodologia com sensibilidade diferente, fator que podem impactar à sua representação na análise prognóstica, o que é um ponto levantado na literatura<sup>11,17,26,91</sup>. O fato dos pacientes deste estudo terem apresentado prognóstico diferente da nossa coorte, reflete essa variação e as características intrínsecas dos pacientes de AdG-MSI. E na nossa coorte, a perda de seguimento afetou as análises prognósticas, pois para uma parcela de pacientes (N=62) os dados de seguimento não puderam ser recuperados. Outro fator importante no AdG-MSI, é que normalmente esses pacientes apresentam-se em estágios iniciais da doença, sendo assim, muitas vezes o tempo de acompanhamento no centro hospitalar se torna menor<sup>26</sup>.

Além disso, este estudo do ICESP não apontou papel prognóstico de EBV quanto à sobrevida ou à recorrência da doença, o que também se diferencia do nosso trabalho, onde EBV parece ter um papel protetor de recidiva. No entanto, esse trabalho indicou correlação positiva entre a presença de EBV e PD-L1, assim como outros estudos brasileiros e mundiais<sup>92</sup>. A literatura sobre os AdGs vem aprofundando cada vez mais as investigações quanto ao status de PD-L1, inclusive indicando os pacientes com sua expressão positiva como aqueles que se beneficiariam de tratamentos de bloqueio de PD1. Isso mostra que os subtipos AdG-EBV e AdG-MSI podem ter diferentes nuances que afetam o resultado de diferentes tratamentos<sup>12,54,64,91</sup>. Cada vez mais

a literatura tem apontado que o papel do microambiente tumoral é muito importante no desfecho tanto do AdG-EBV, quanto do AdG-MSI, e é justamente a análise combinada destes marcadores e dos fatores do microambiente tumoral que pode prover melhores alternativas de tratamento<sup>64,93,94</sup>.

### **4.3. Perfil molecular: MSI, ancestralidade genômica, CMT e assinaturas mutacionais**

Além do status MSI, realizamos também o estudo da ancestralidade genômica e análise da carga e das assinaturas mutacionais dos tumores. Para assim fornecer uma avaliação mais completa das características clínico-moleculares dos pacientes e suas relações com o prognóstico no AdG-EBV e AdG-MSI.

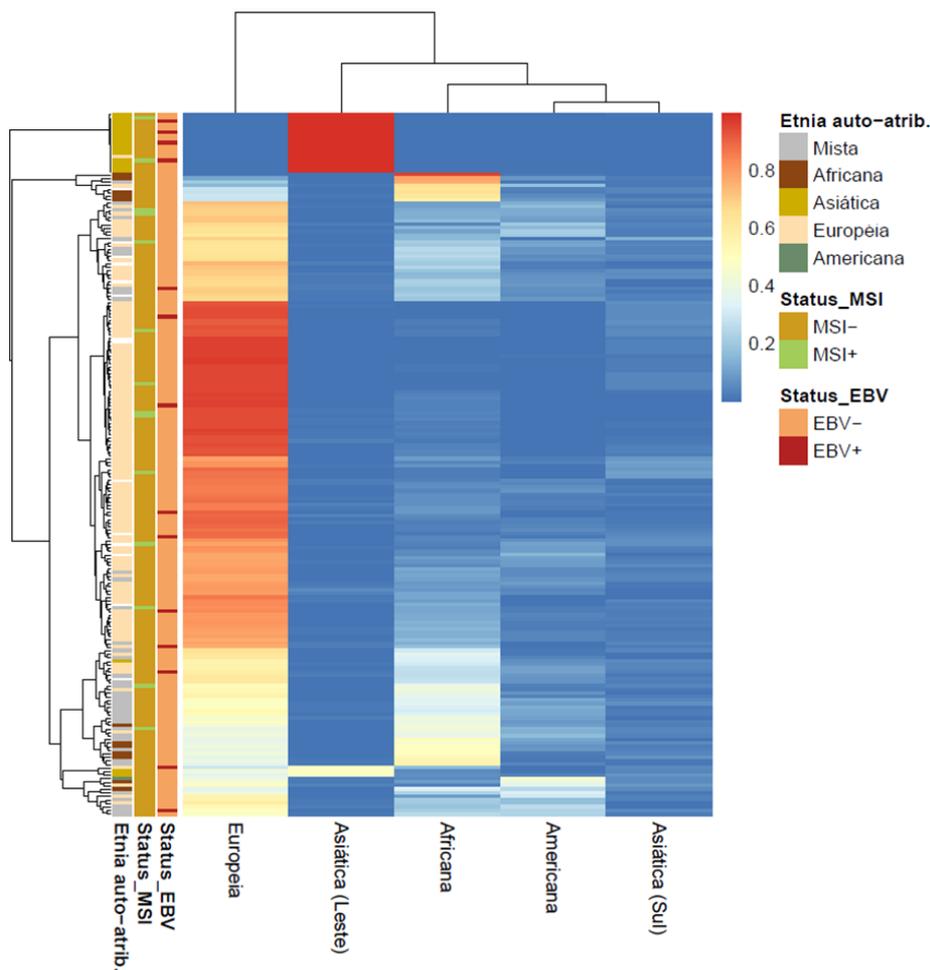
#### **4.3.1 Ancestralidade genômica e prognóstico no AdG-EBV e AdG-MSI**

A ancestralidade genômica dos pacientes foi inferida com base nos dados de sequenciamento de exoma, através de um *pipeline* de bioinformática que possibilita a chamada de variantes germinativas marcadoras de ancestralidade. Foi considerada a ocorrência de uma ancestralidade predominante em cada paciente quando 50% dos marcadores estavam associados a uma única ancestralidade. Aqueles que não demonstraram uma ancestralidade atingindo pelo menos 50% foram denominados com ancestralidade mista. A principal ancestralidade genômica identificada na nossa coorte total foi a europeia (tabela 2), demonstrando concordância com a etnia auto-atribuída pelos pacientes e refletindo a representação da coorte (tabela 1 e figura 7). O que pode ainda denotar um possível efeito de fatores socioeconômicos, pois atualmente a quase totalidade dos casos do ACCCC é oriunda de planos de saúde complementar. Interessantemente, apesar da ancestralidade europeia ser predominante, a ancestralidade asiática (leste asiático) foi importante e se mostrou predominante em 4/14 pacientes EBV+ e 2/14 MSI+. Vale ressaltar que dos 17 casos asiáticos totais, os 4 que eram EBV+ tiveram predominância atingindo mais de 90% dos marcadores. Esse resultado pôde ser visualizado pela distribuição das ancestralidades através do *Heatmap*, pela formação de uma clusterização da ancestralidade asiática, além da clusterização europeia (figura 7).

**Tabela 2-** Ancestralidade Genômica no AdG-EBV e AdG-MSI.

	AdG (n=198)	Status EBV		Status MSI	
		n (%)	EBV-	EBV+	MSI-
		184 (92,9)	14 (7,1)	184 (92,9)	14 (7,1)
<b>Ancestralidade genômica</b>					
Asiática (Leste)	17 (8,60)	13 (7,1)	4 (28,6)	15 (8,2)	2 (14,3)
Europeia	147 (74,20)	139 (75,5)	8 (57,1)	136 (73,9)	11 (78,6)
Africana	12 (6,10)	12 (6,5)	0 (0)	12 (6,5)	0 (0)
Mista	22 (11,10)	20 (10,9)	2 (14,3)	21 (11,4)	1 (7,1)
<i>p value</i> <sup>a</sup>			0,050		0,809

Legenda: Foi definida como predominante a ancestralidade presente acima de 50% em cada indivíduo. Teste estatístico: a- Exato de Fisher. Em vermelho, o *p value* quando apresentada significância ( $p < 0,05$ ). A inferência da ancestralidade foi realizada a partir de dados de sequenciamento utilizando a ferramenta *GATK HaplotypeCaller*, foi aplicado filtro VQSR e identificadas as variantes nas regiões de SNPs do banco HGDP+1000G.



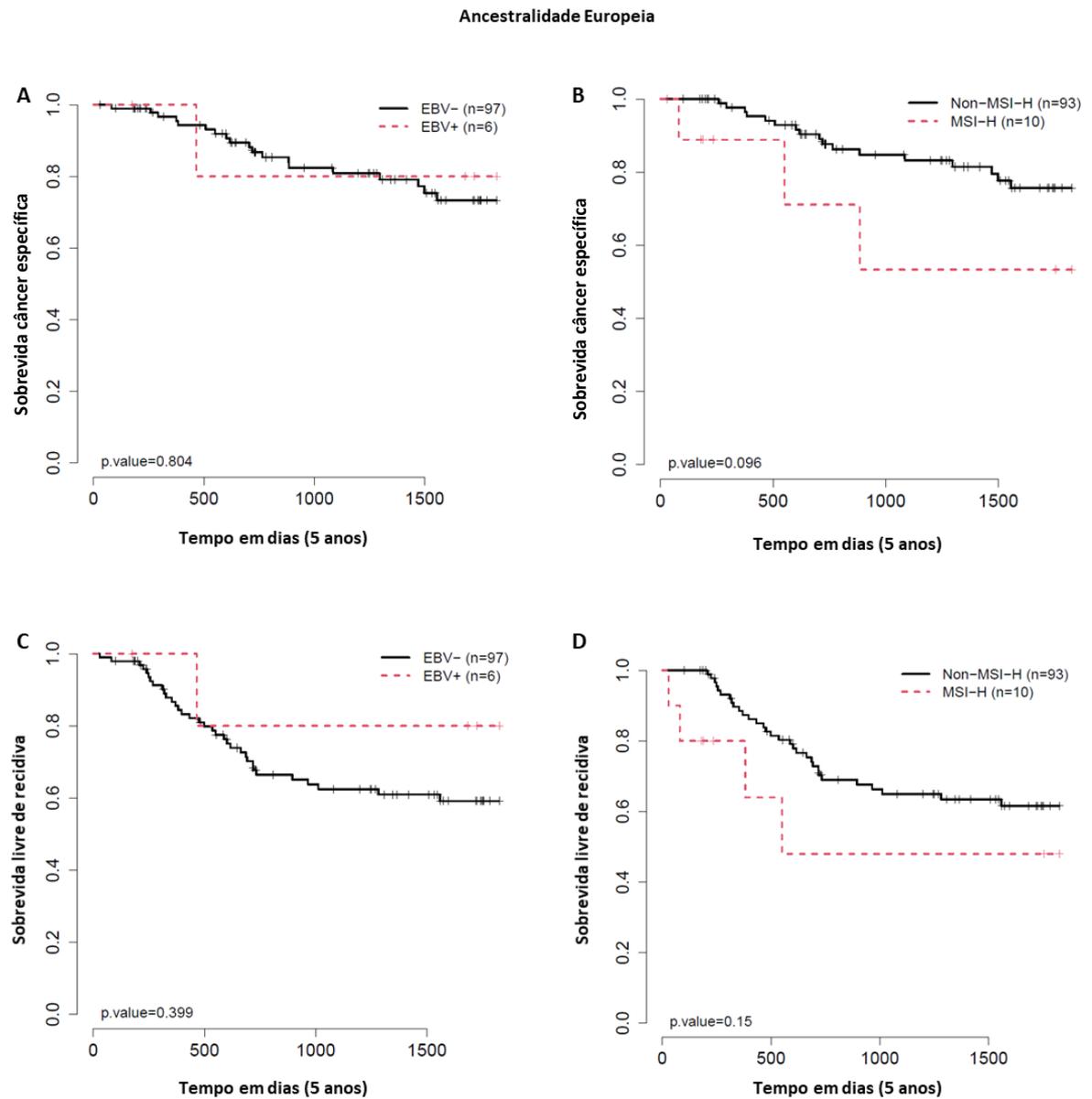
**Figura 7-** Distribuição da Ancestralidade Genômica no AdG-EBV e AdG-MSI. Etnia auto-atrib.: etnia auto-atribuída pelo paciente de acordo com prontuário médico.

Em nosso trabalho não observamos casos com ancestralidade africana predominante nem no grupo EBV+ ou MSI+. Diferente de trabalho anterior do nosso grupo, que observou a ancestralidade africana em 2/5 casos EBV+, porém nesse estudo a metodologia foi aplicada por leituras *off target* de painel gênico <sup>45</sup>, com menor quantidade de marcadores, e aqui utilizamos sequenciamento de exoma completo. Um outro estudo que avaliou uma coorte de São Paulo, identificou a prevalência de EBV em 16% dos casos de pacientes negros, 10,3% dos caucasianos e 4,7% dentre os nipo-brasileiros <sup>67</sup>. E um outro trabalho feito no Brasil, Campanella et al (2014), investigaram a validação de um painel para determinação do status MSI e correlacionaram os achados a marcadores moleculares de ancestralidade, identificando em concordância ao nosso trabalho, a relação entre MSI+ e predominância de ancestralidade europeia, só que em segundo, da africana, ao invés da asiática como vimos aqui. Esses resultados refletem também o perfil populacional de cada estudo <sup>95</sup>.

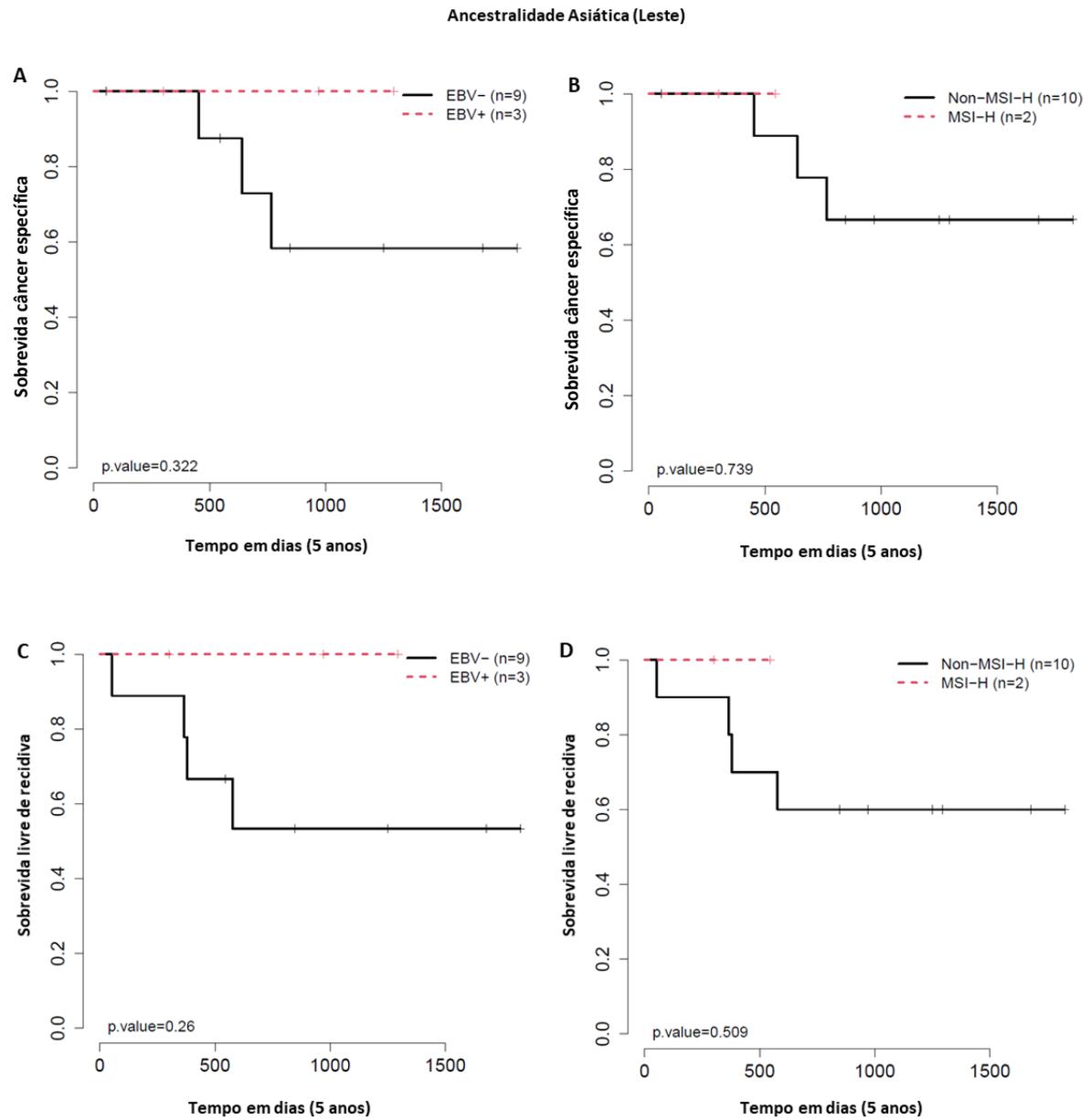
A literatura nos mostra que a prevalência e prognóstico do AdG varia mundialmente, sendo que fatores geográficos e étnicos estão envolvidos nesse contexto <sup>26,30,32,71</sup>. Karalis et al (2021), demonstraram que dentro de uma mesma população, os aspectos clínicos do AdG podem variar de acordo com a origem da ancestralidade dos pacientes <sup>96</sup>. No Brasil, Guimarães et al (2012), observaram ainda que o AdG varia em incidência e mortalidade de acordo com as regiões. Esse é um estudo mais antigo, que avaliou casos entre 1980 a 2009, e naquela época, as regiões Central, Sul e Sudeste mostraram declínio, enquanto no Nordeste não foi observada diferença, e no Norte as tendências de incidência e mortalidade cresciam <sup>97</sup>. Esses achados nos relembram como fatores clínico-biológicos, étnicos, socioeconômicos e entre outros, se relacionam e são importantes para elucidar os aspectos clínicos intrínsecos para o desenvolvimento do AdG em cada população <sup>65,71</sup>.

Avaliamos aqui também a relação da ancestralidade genômica predominante e o prognóstico nos subtipos AdG-EBV e AdG-MSI. Nesta análise, também excluimos os casos com metástase ao diagnóstico, seguindo o mesmo conceito das análises anteriores. Analisamos apenas as situações onde havia um N de pelo menos 2 casos nos dois subtipos, e deste modo os dados de sobrevidas em relação as ancestralidades africana e mista não serão apresentados. No cenário da ancestralidade europeia, os casos EBV+ apresentaram tendências de sobrevidas CE e livre de recidiva em 5 anos semelhantes aos EBV-, já os casos MSI+, apresentaram tendências menos favoráveis que os MSI- (figura 8). Quanto a ancestralidade asiática, os casos EBV+ apresentaram tendências de sobrevidas CE e livre de recidiva mais favoráveis quando comparados aos negativos. Já os casos MSI+, mantiveram o mesmo panorama (figura 9). No

entanto, não observamos diferenças estatísticas entre os grupos dos marcadores em nenhum dos cenários de ancestralidade predominante (nem associação à taxa de risco). Dado que pacientes asiáticos geralmente apresentam melhor prognóstico no AdG como um todo, pelo que é relatado na literatura <sup>29</sup>, poderíamos esperar que os casos com ancestralidade asiática predominante da nossa coorte se sobressaíssem nos resultados. Porém, nesta análise o N amostral se torna muito restrito e não pudemos observar esse efeito de modo mais marcante aqui. Mas assim como nas análises de prognóstico geral, os casos EBV+ parecem ter melhor resultado, e outros trabalhos têm mostrado melhores chances àqueles casos positivos no Brasil <sup>92</sup>. Já os nossos casos MSI+ parecem ser afetados por algum outro fator, mesmo que sejam excluídos os casos de metástase da análise. Para o AdG-MSI não há muitas investigações tão aprofundadas no cenário brasileiro, e na maioria das coortes mundiais a representação étnica acaba sendo escassa. Como outros autores já relataram, aqui também apontamos que são necessários estudos mais abrangentes para conhecermos melhor a heterogeneidade de fatores envolvidos no AdG <sup>14,26,98</sup>.



**Figura 8-** Tendências de sobrevida em 5 anos no AdG-EBV e AdG-MSI com ancestralidade europeia predominante. (A) Sobrevida câncer específica no AdG-EBV (HR: 0,8622 [0,114; 6,518],  $p=0,886$ ), e (B) no AdG-MSI\* (HR: 2,6983 [0,785; 9,276],  $p=0,115$ ). (C) Sobrevida livre de recidiva no AdG-EBV (HR: 0,4633 [0,063; 3,4],  $p=0,449$ ), e (D) no AdG-MSI\* (HR: 2,0388 [0,717; 5,8],  $p=0,182$ ). \*Non-MSI-H=MSI- e MSI-H=MSI+.



**Figura 9-** Tendências de sobrevida em 5 anos no AdG-EBV e AdG-MSI com ancestralidade asiática predominante. (A) Sobrevida câncer específica no AdG-EBV (HR: 0 [0; 100],  $p=0,999$ ), e (B) no AdG-MSI\* (HR: 0 [0; 100],  $p=1$ ). (C) Sobrevida livre de recidiva no AdG-EBV (HR: 0 [0; 100],  $p=0,999$ ), e (D) no AdG-MSI\* (HR: 0 [0; 100],  $p=1$ ). \*Non-MSI-H=MSI- e MSI-H=MSI+.

### 4.3.2. CMT e assinaturas mutacionais no prognóstico do AdG-EBV e AdG-MSI

A CMT foi estimada através de dados de exoma de acordo com pacote *Maftools* (R versão 4.1.2), que é recomendado pela literatura, onde geralmente, refere-se a CMT normalizada por Megabase (CMT/MB), ou seja, o número de mutações observadas em cada 1 milhão de bases sequenciadas dentro da cobertura requerida <sup>79,99,100</sup>. Neste trabalho, utilizamos um painel de captura de exoma com total de 60.507.855 bases nucleotídicas sequenciadas. Foram incluídos nas análises deste bloco apenas os dados de sequenciamento a partir de amostra de tecido tumoral. Antes de estimar a CMT, foi aplicado filtro de sinal de alerta de artefatos do *Maftools*, além da filtragem prévia de padrão de qualidade (GATK4). No cenário do AdG-EBV, não foi observada relação significativa da CMT com os grupos EBV- ou EBV+, embora, este último grupo tenha apresentado média de CMT maior que a média da coorte total (tabela 3 e figura 10). Enquanto no AdG-MSI, se destacou uma associação significativa entre a CMT e a positividade para MSI, sugerindo que a nossa chamada de positividade está correta. Pois os pacientes do grupo MSI+ apresentaram CMT alta, acima da média geral da coorte (tabela 3 e figura 11).

Assim como discorrido sobre a avaliação de MSI, também é discutido na literatura qual seria a melhor forma de estimar a CMT. Atualmente, as metodologias de sequenciamento de nova geração permitem uma estimacão mais real da CMT através de algoritmos de análise dos dados. O exoma é a técnica mais empregada e pode detectar mutacões em todas as regicões exônicas do genoma. Por outro lado, muitos painéis gênicos também foram desenvolvidos para esta análise, mas há uma limitacão do número de genes definidos no painel, sendo algo mais focado em um perfil tumoral específico. Os painéis gênicos têm menor custo que o exoma, porém são menos abrangentes. Um estudo retrospectivo comparou dados de CMT derivados de exoma e de painel, e reportaram que os dados advindos do painel gênico haviam uma superestimacão de 3 vezes comparados aos dados de CMT através de exoma, talvez até por estes painéis serem comumente compostos por genes com maior frequêcia mutacional. Ademais, outros estudos relataram discrepâncias entre estes métodos, mas um estudo nessa questão identificou correlaçã entre os dados por ambas metodologias, este estudo utilizou linhagens celulares ao invés de amostras tumorais <sup>99</sup>.

O ponto de corte das mutacões para análise também é uma questão aberta, a maioria dos autores aplicam o valor empírico de 10 mutacões por MB (mut/MB), e o segundo modo mais comum é uma porcentagem/média calculada dentro da coorte. Além disso, a CMT varia de acordo com

o tipo tumoral e as próprias características de cada coorte <sup>99,101</sup>. Na nossa casuística, por exemplo, verificamos que a distribuição da CMT dos casos MSI+ teve média de 20,7 mut/MB, quando a média da coorte geral foi de 4,4 mut/MB (tabela 3), reforçando a validade da abordagem e dos resultados aqui obtidos para indicar o status de MSI por análise de exoma. O valor de 10mut/MB mostrou-se ineficaz para definição de grupos de análise neste caso.

**Tabela 3-** Carga mutacional tumoral no AdG-EBV e AdG-MSI.

CMT / MB	Status EBV		Status MSI		Total n=194
	EBV-	EBV+	MSI-	MSI+	
Média	4,3	6,3	3,2	20,7	4,4
Mediana	2,9	3,3	2,8	18,0	2,9
<i>p value</i> <sup>d</sup>	0,238		0,000*		

Legenda: CMT/MB: Carga mutacional tumoral por megabase sequenciada. Estimada CMT através de dados de exoma de amostras de tecido tumoral (conforme *Maftools*). *d*- Teste U de Mann-Whitney. Em vermelho, indicado o valor de *p* quando inferior a 0,01(\*).

Além de avaliar a associação da CMT com os grupos dos marcadores, buscamos compreender sua relevância no prognóstico da nossa coorte. Inicialmente, não observamos relação estatística da CMT com a sobrevida geral da coorte. Tanto de acordo com corte definido pelo algoritmo de análise (*smartcut*) ou pelos quartis, onde é analisado o quartil superior (75%) e inferior (25%) em relação a CMT/MB em log (figura 12 A-B). Para o AdG-EBV não foi possível investigar essa relação, pois os casos positivos e negativos não mostraram diferença quanto a CMT. Enquanto no AdG-MSI, onde observamos relação significativa com a CMT, os pacientes MSI+ com maior CMT (pelo *smartcut*) apresentaram significativamente melhores tendências de sobrevida CE ( $p=0,018$ ) e livre de recidiva ( $p= 0,006$ ) (figura 12 C-D). Para estas avaliações foram excluídos os casos com metástase ao diagnóstico, e foi usada a CMT/MB em log que é mais indicado neste tipo de análise. Aqui, se mostrou um novo panorama para os casos MSI+, que até então na análise geral apresentavam prognóstico diferente do reportado para este subtipo. Demonstrando assim a importância de uma abordagem que mensure as sutis e múltiplas camadas do AdG-MSI.

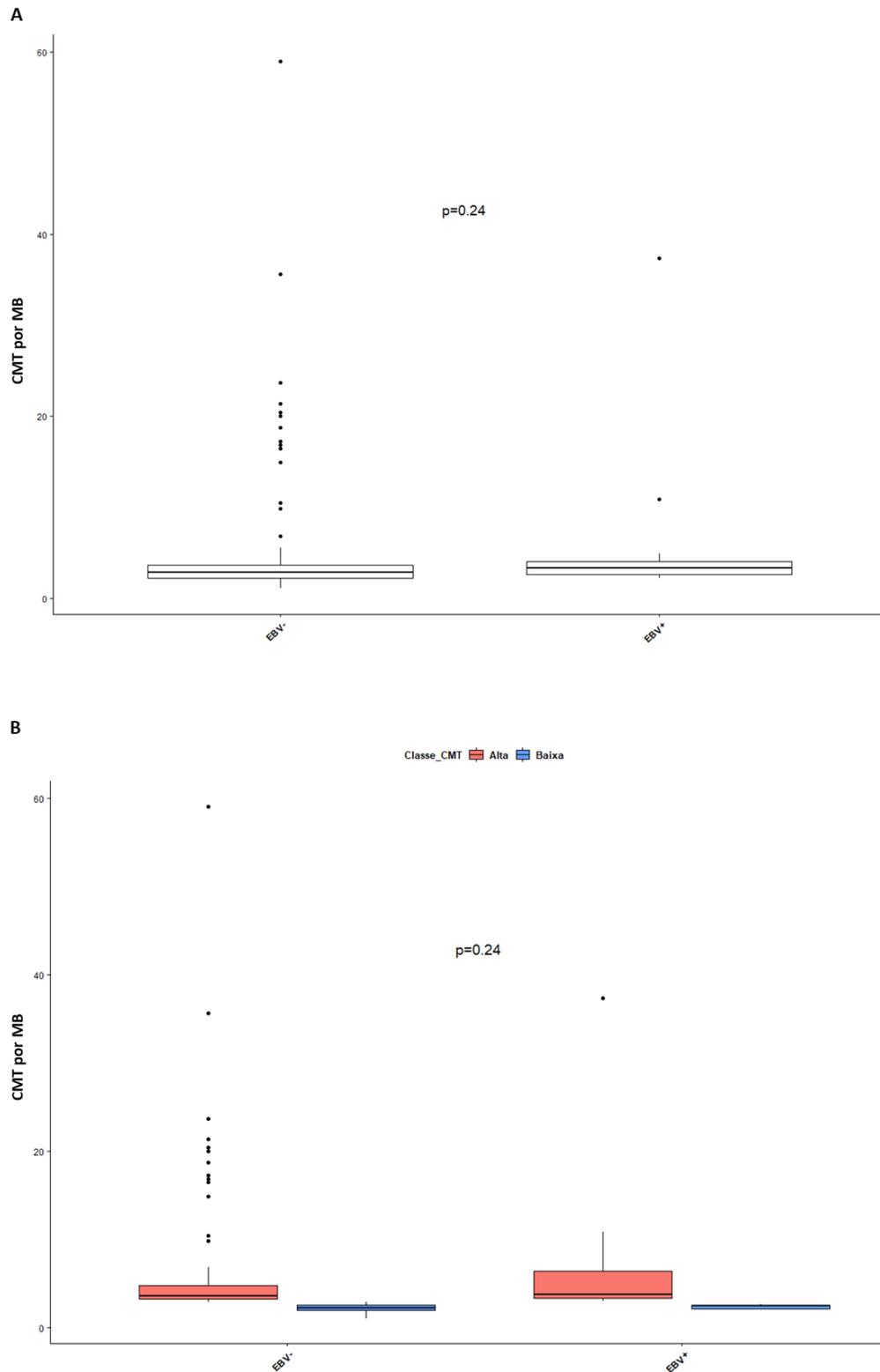
Zou et al, 2021, avaliaram também o prognóstico dos pacientes em relação a CMT. A qual foi estimada por exoma em uma coorte de 309 pacientes que realizaram imunoterapia, de 5 diferentes tipos tumorais. Deste total, apenas 19 casos eram de CG e estes tiveram uma média de CMT/MB de 3,69. Ao analisarem a sobrevida global de acordo com tercís, os pacientes com maior CMT (tercil superior) demonstraram melhor sobrevida, apesar de não apresentarem diferença estatística. E dividindo pelo corte de 10mt/MB, não foi possível realizar a análise devido ao desbalanço entre os casos por essa divisão, mostrando que esse corte empírico não parece ser a melhor estratégia de análise no CG <sup>99</sup>.

Na literatura, a CMT é considerada um biomarcador para o tratamento imunoterápico com inibidores de *checkpoints* em vários tipos de câncer. Justamente pela associação da CMT com maior produção de neoantígenos, os quais estão inseridos neste contexto como alvos da imunoterapia <sup>101,102</sup>. Um estudo retrospectivo objetivou investigar a vida real da aplicação da CMT e MSI como biomarcadores. Foi identificado então um perfil molecular com CMT alta (>20 mut/MB) e MSI+ em 157 pacientes de 27 tipos tumorais diferentes, incluindo o CG. Assim como no presente trabalho, houve associação entre a CMT e o status MSI+. Os autores avaliaram também a sobrevida e a resposta a diferentes combinações de tratamentos de imunoterapia vs quimioterapia, onde os pacientes desse perfil tiveram melhor resultado com a imunoterapia. O estudo aponta que estes dados reforçam o fato de que a CMT pode ser um biomarcador para tumores MSI e que os pacientes com estes perfis se beneficiam da imunoterapia, de forma independente do tipo tumoral ou regime anterior de tratamento <sup>103</sup>. Nossos resultados indicam um prognóstico mais favorável para os pacientes MSI+ com CMT alta, diferente do que foi identificado inicialmente quando olhamos apenas para o status MSI como um todo na coorte. Portanto, esse resultado nos indica haver uma relação importante entre o status MSI e a CMT com o prognóstico no AdG-MSI, fatores estes que são relacionados justamente à característica de hipermutação deste subtipo de AdG <sup>26</sup>.

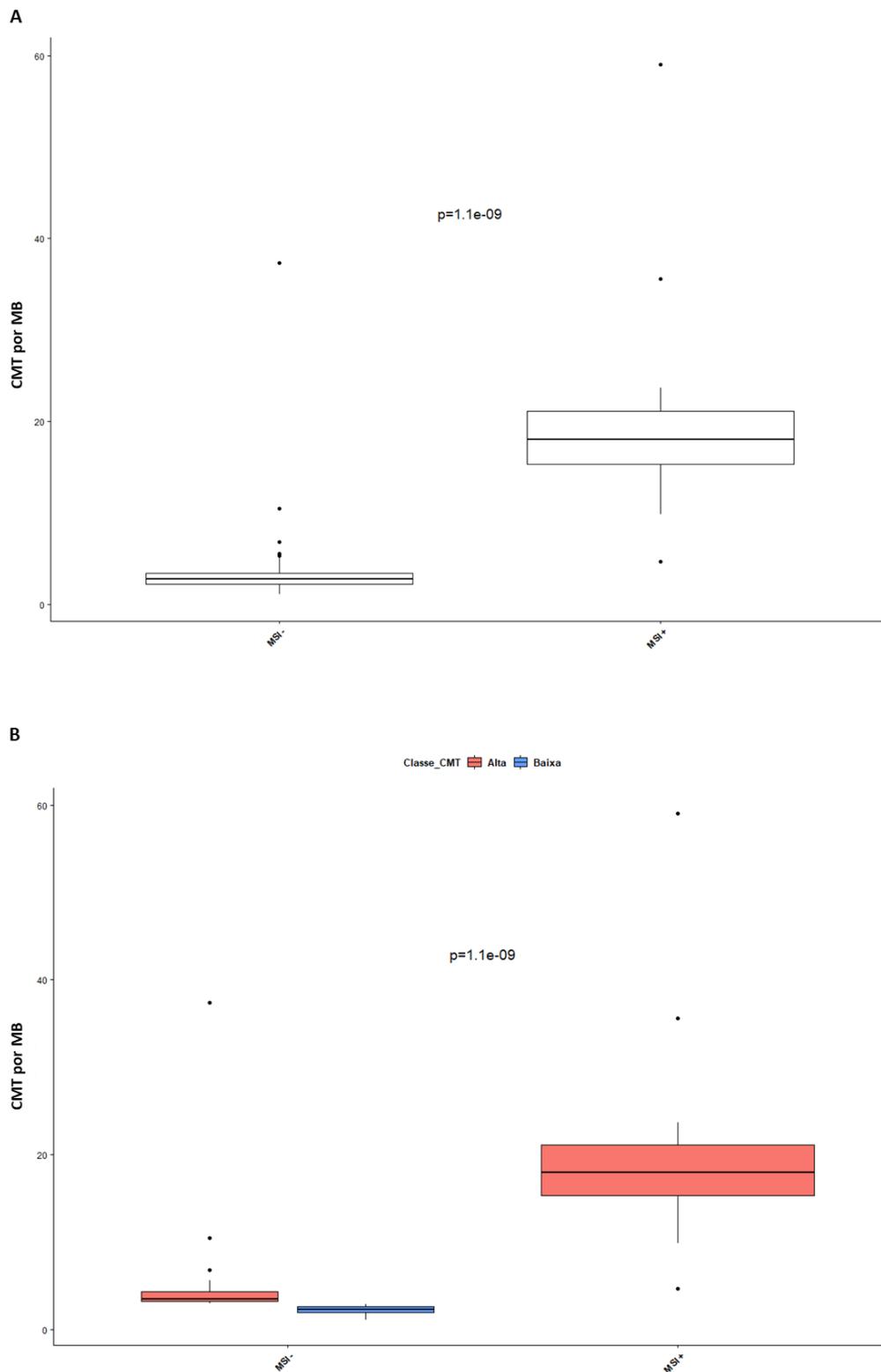
Para compreender o perfil molecular dos tumores, avaliamos também as assinaturas mutacionais tendo como base os dados de exoma. Assim, usando o banco de dados COSMIC, verificamos se o perfil de assinaturas da coorte se equipara ao que já é estabelecido para o CG. Dessa forma, avaliamos a exposição diferencial das assinaturas do COSMIC presentes na coorte. Este resultado revelou concordância entre o status MSI determinado e as assinaturas SB15, SB20, SB21 e SB26, que são correspondentes a deficiência em MMR, e as assinaturas relacionadas principalmente a idade, SB1 e SB5, todas presentes no grupo MSI + (tabela 4). Para validar esse achado, buscamos nos bancos de dados da nossa Instituição dados de testagem

de MMR por IHQ. No entanto, observamos pequena sobreposição da nossa coorte com a coorte onde o status de MSI foi avaliado por IHQ. A sobreposição observada foi de apenas 53 casos estudados e todos eram MSI-.

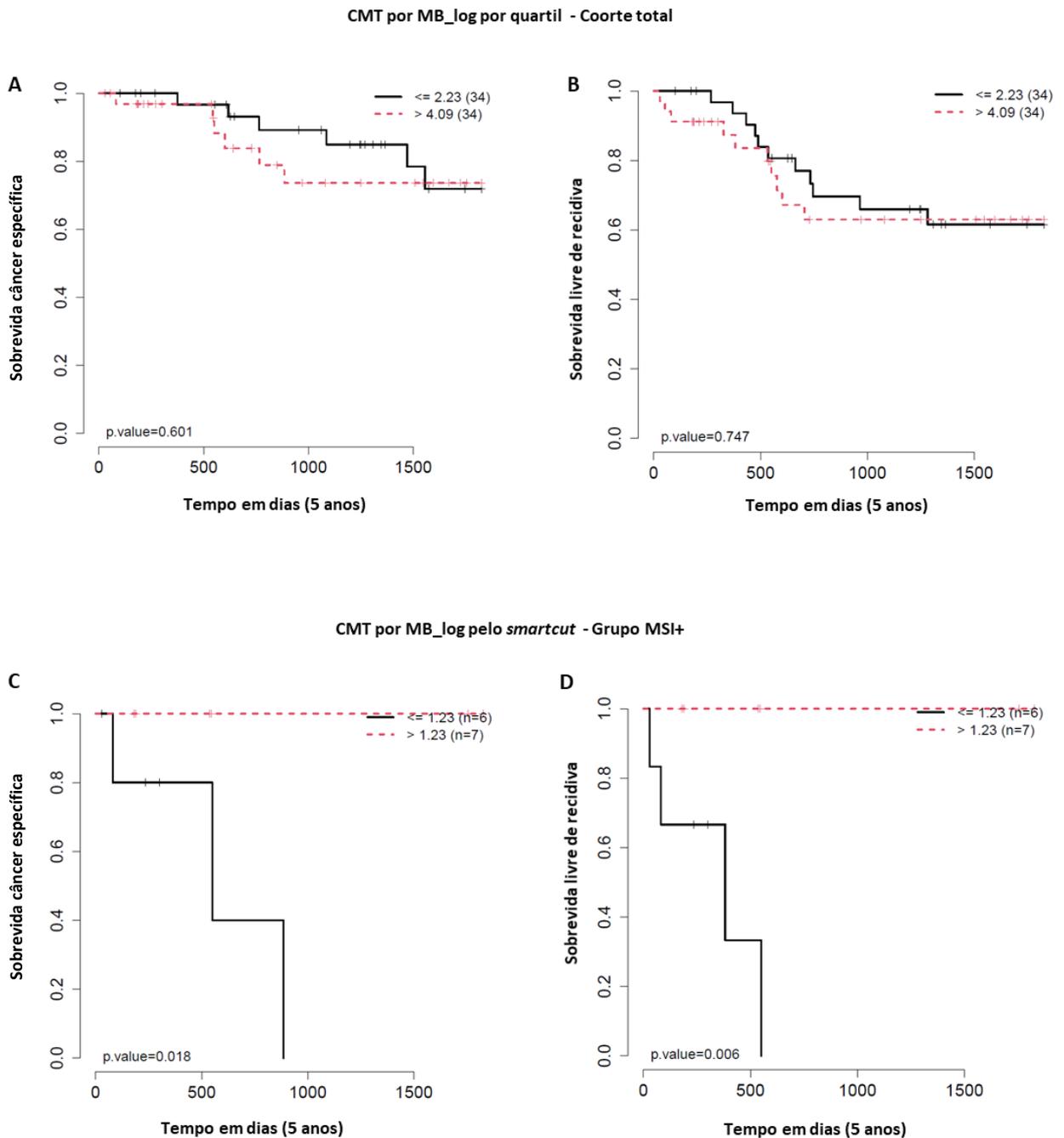
No contexto do AdG-EBV, nenhuma assinatura se destacou quanto à exposição diferencial no grupo EBV+. Quanto ao prognóstico da coorte em relação as assinaturas, os casos com maior exposição das assinaturas SBS1 ( $p= 0,0155$ ) e SBS20 ( $p= 0,0225$ ) apresentaram uma pior tendência de sobrevida CE, e da SBS10b ( $p= 0,0435$ ), uma menor tendência de sobrevida livre de recidiva. Por outro lado, a maior exposição da assinatura SBS13 ( $p= 0,045$ ) se relacionou significativamente a uma maior sobrevida livre de recidiva, e da SBS2 aos dois cenários de sobrevida, CE,  $p=0,0285$ ; e livre de recidiva,  $p= 0,041$  (figura 13). Considerando o tempo total de seguimento, e excluídos casos de metástase ao diagnóstico. As assinaturas SBS2 e SBS13 correspondem ao perfil de atividade da família APOBEC. Esse perfil já foi descrito em associação ao AdG-EBV. Justamente, na nossa coorte, o grupo EBV+ apresentou melhor prognóstico quanto a ocorrência de recidivas, pois nenhum caso recidivou. Sugerindo que estes casos EBV+ poderiam estar relacionados a estas assinaturas. Embora neste grupo não tenha se destacado um perfil de assinatura mutacional, é possível compreender que o tamanho da casuística possa mascarar o resultado esperado <sup>44,104</sup>.



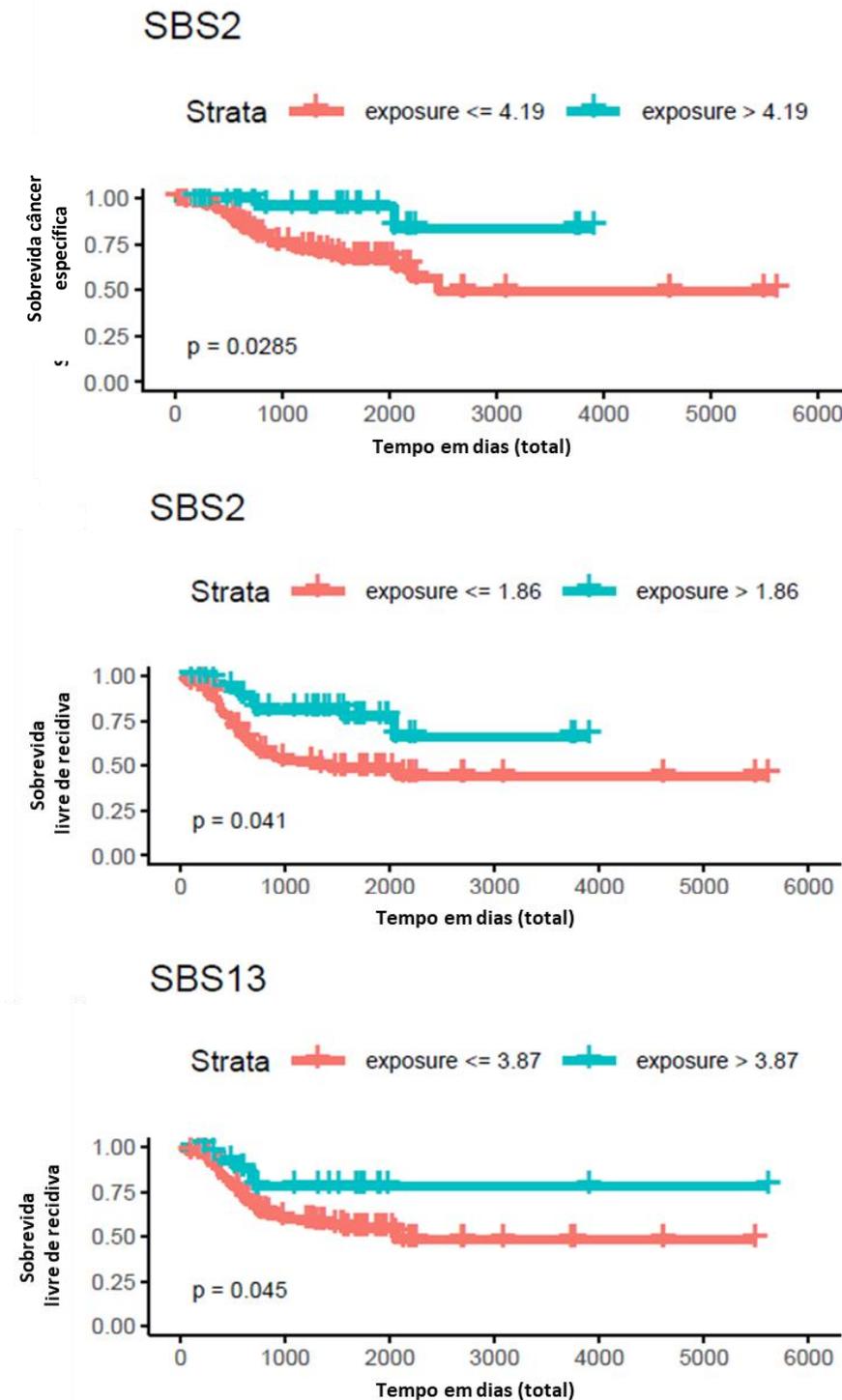
**Figura 10-** Carga mutacional tumoral (CMT) no AdG-EBV. (A) CMT por Megabase (CMT/MB) dos grupos EBV- e EBV+. (B) Classificação de acordo com a média de CMT/MB dos grupos EBV- e EBV+. Rosa: CMT alta, acima da média. Azul: CMT baixa, menor que a média. Análise de acordo com *Maftools* (R versão 4.1.2).



**Figura 11-** Carga mutacional tumoral (CMT) no AdG-MSI. (A) CMT por Megabase (CMT/MB) dos grupos MSI- e MSI+. (B) Classificação de acordo com a média de CMT/MB dos grupos MSI- e MSI+. Rosa: CMT alta, acima da média. Azul: CMT baixa, menor que a média. Análise de acordo com *Maftools* (R versão 4.1.2).



**Figura 12-** CMT e tendências de sobrevida em 5 anos. (A) Sobrevida câncer específica e (B) sobrevida livre de recidiva da coorte geral pelo quartil superior e inferior de CMT por MB (CMT/MB) em log (A- HR: 1,126 [0,28; 4,534],  $p=0,867$ . B- HR: 0,8367 [0,276; 2,533],  $p=0,752$ ). (C) Sobrevida câncer específica e (D) sobrevida livre de recidiva do grupo MSI+ de acordo com corte (*smartcut*) para CMT/MB em log definido pelo algoritmo de análise (C- HR:  $1e-04$  [0; 18,998],  $p=0,14$ . D- HR: 0.0014 [0; 0,71],  $p=0,039$ ).



**Figura 13-** Perfil de assinaturas do SBS2 e SBS13 do COSMIC relacionados ao prognóstico da coorte. SBS2, relacionada às sobrevidas câncer específica e livre de recidiva, SBS13 relacionada somente a sobrevida livre de recidiva. Tempo de seguimento total e excluídos casos com metástase ao diagnóstico. *Strata*: distribuição da exposição. *Exposure*: grau de exposição da assinatura identificada.

A assinatura SBS1 se relaciona a idade, e a SBS10b a uma característica de mutação no domínio de correção de base da polimerase. Estes são perfis são compatíveis com nossa coorte e podem impactar o prognóstico, devido as características clínico-moleculares descritas na literatura do AdG, como prevalência de pacientes mais velhos no CG e a associação a taxa elevada de mutações no AdG-EBV e AdG-MSI<sup>84,91,104</sup>. Já a assinatura SBS20, que é relacionada ao perfil de MSI<sup>104</sup>, e foi confirmada essa relação no grupo MSI+ da coorte, demonstrou tendência de pior prognóstico para os casos com maior exposição. Dessa forma, se confirmaria o resultado observado na análise do prognóstico inicial para os pacientes com perfil MSI+. Como já discutido anteriormente, esse resultado é diferente do reportado na literatura para o AdG-MSI. Então, buscamos compreender este cenário de forma mais completa.

Para validação do perfil de assinaturas de CG identificado, foi realizada uma nova abordagem, chamada de extração de assinaturas “de novo”<sup>79</sup>. Foi definido através do software SigneR um novo perfil de assinaturas que apresentara maior exposição na coorte de forma independente de um perfil de referência. As assinaturas encontradas então foram comparadas aquelas do COSMIC pelo teste de similaridade de Cosine (figura 14). A partir desse resultado, foi mais uma vez confirmado o status MSI e a relação com a idade, pois as assinaturas destacadas no grupo MSI+, SigneR.S2 (S2) e SigneR.S3 (S3), corresponderam as assinaturas descritas no COSMIC SBS1 (idade e desaminação da 5-metilcitosina); e também a SBS6, SBS15 e SBS44 (deficiência em MMR). Estes resultados foram concordantes com aqueles observados por Buttura et al, 2021, que identificou estas mesmas assinaturas em dados de uma coorte do TCGA com 787 pacientes de CG e também na sua coorte de validação<sup>79</sup>. Já as assinaturas identificadas no grupo MSI-, a SigneR.S7 (S7) não se relacionou a nenhum perfil do COSMIC, e a assinatura SigneR.S4 se relacionou a SBS45 que é descrita como uma assinatura de artefato de sequenciamento. Para o AdG-EBV, não foi destacado um perfil de assinatura mutacional pela análise “de novo”. Então, apesar das diferentes estratégias empregadas, infelizmente, se configurou uma limitação a este trabalho aprofundar a investigação quanto a presença de EBV e as assinaturas mutacionais da coorte.

**Tabela 4-** Assinaturas relacionadas ao câncer gástrico (CG) do banco COSMIC identificadas no grupo MSI+.

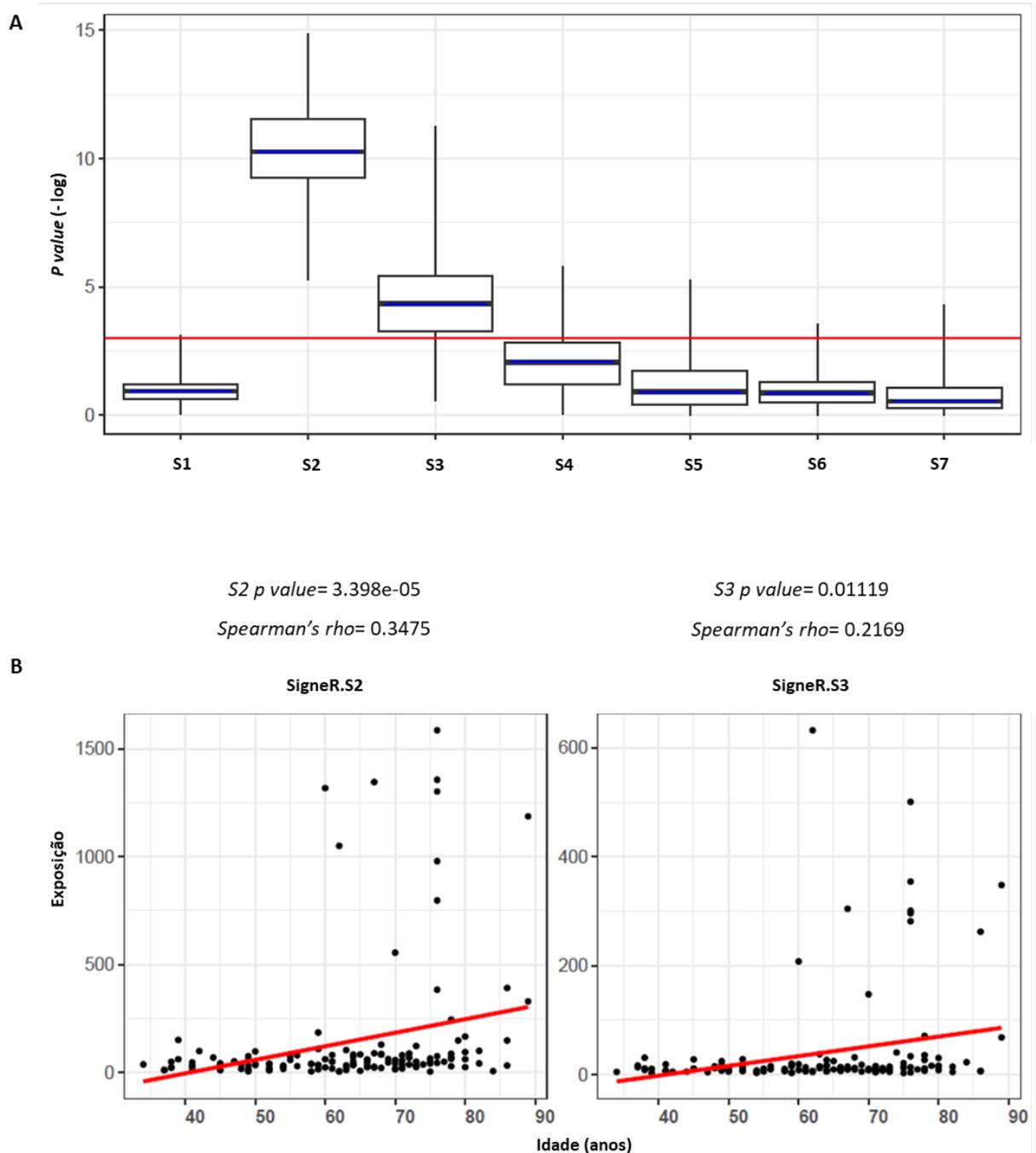
<b>Exposição diferencial no grupo MSI+</b>		
<b>Assinatura CG</b>	<b><i>p value</i></b>	<b>Processo biológico relacionado</b>
<b>SBS1</b>	<b>4,90E-09</b>	<b>Idade + Desaminação espontânea da 5-metilcitosina</b>
SBS2	0,3417	Atividade AID/APOBEC
SBS3	0,592	Deficiência no reparo de DNA (MMR)
<b>SBS5</b>	<b>0,005</b>	<b>Idade + Associação ao tabaco</b>
SBS10b	0,214	Mutações no domínio exonuclease da polimerase
SBS13	0,164	Atividade AID/APOBEC
<b>SBS15</b>	<b>0,000</b>	<b>Deficiência no reparo de DNA (MMR)</b>
SBS17a	0,207	Dano por ROS (evidência pouco clara)
SBS17b	0,711	Danos por ROS + 5F quimioterapia (evidência pouco clara)
SBS18	0,475	Dano por ROS
<b>SBS20</b>	<b>0,000</b>	<b>Deficiência no reparo de DNA (MMR) + Mutações em POLD1</b>
<b>SBS21</b>	<b>0,019</b>	<b>Deficiência no reparo de DNA (MMR)</b>
<b>SBS26</b>	<b>8,11E-05</b>	<b>Deficiência no reparo de DNA (MMR)</b>
SBS28	0,466	Desconhecido
SBS34	0,494	Desconhecido
SBS40	0,457	Desconhecido
SBS41	0,527	Desconhecido
SBS44	0,098	Deficiência no reparo de DNA (MMR)
SBS93	0,512	Desconhecido

Legenda: CG: Câncer Gástrico; MMR: *Mismatch Repair*; ROS: espécies reativas de oxigênio; 5F: 5-fluoracil.

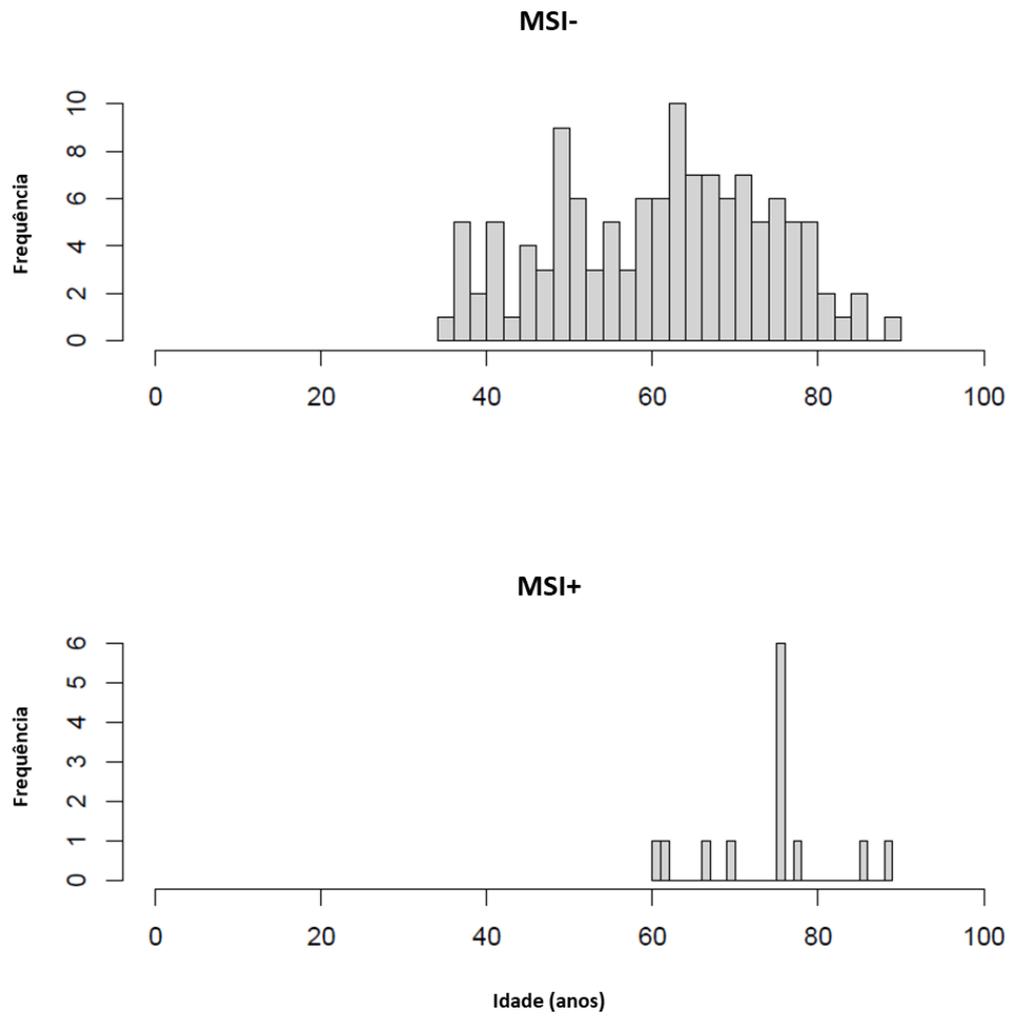
Em vermelho, o *p value* quando apresentada significância ( $p < 0,05$ ). Em negrito, as assinaturas que se relacionaram ao grupo MSI+.



O prognóstico dos pacientes MSI+ foi re-analisado de acordo com o novo perfil de assinaturas, e somente a assinatura S2 demonstrou diferença significativa. Os pacientes com maior exposição desta assinatura também apresentaram menor tendência de sobrevida CE ( $p=0$ ) e livre de recidiva ( $p= 0,01$ ). Este resultado mais uma vez corroborara o prognóstico da análise inicial. Os pacientes MSI+ teriam pior sobrevida, porém, ao verificar as características deste grupo em especial é possível entender de forma mais ampla o seu prognóstico. Identificamos de acordo com o coeficiente de Spearman (*Spearman's rho*), uma correlação positiva das assinaturas S2 com uma idade mais avançada no grupo MSI+ (figura 15). Essa correlação de Spearman é baseada na ordenação dos dados, e assim não supõe nenhuma distribuição prévia para eles, ao contrário do teste de correlação de Pearson, que pressupõe uma distribuição normal, o que não é aplicável neste contexto de exposições de assinaturas. Além disso, foi verificado que todos os casos MSI+ possuem idade superior a 60 anos ( $p= 7,153E-05$ ; figura 16), o que pode configurar um fator de risco ao pior prognóstico no AdG-MSI <sup>11,26</sup>. Esta hipótese foi comprovada no grupo MSI+ através do teste de Log-Rank, onde a taxa de risco (HR) relacionada a idade foi maior que 1. Esse resultado indica que quanto maior a idade do paciente, maior o risco de óbito/recidiva (figura 17). Em conjunto, estes resultados apontam que a idade é realmente um fator predominante no pior prognóstico do AdG-MSI. Por outro lado, interessante, quando a sobrevida e o risco são avaliados em relação a CMT, essa se torna o fator de fato predominante e modifica a janela de prognóstico (figuras 18 e 22). Ao verificar a taxa de risco do grupo MSI+ considerando idade e CMT, a influência da CMT prevaleceu. Quanto maior a CMT, menor foi o risco de recidivas (figura 16) e melhor as sobrevidas CE e livre de recidiva em 5 anos (figura 12). Dessa forma, podemos compreender que o resultado prognóstico dos pacientes MSI+ estava estatisticamente diluído na análise da coorte total. De acordo com o contexto do prognóstico e características clínico-moleculares do AdG-MSI relatado na literatura, ao aprofundar a investigação desse perfil MSI+ caracterizado pelas assinaturas relacionadas a MMR, e com CMT alta, os pacientes apresentam prognóstico favorável <sup>26,79,99</sup>.

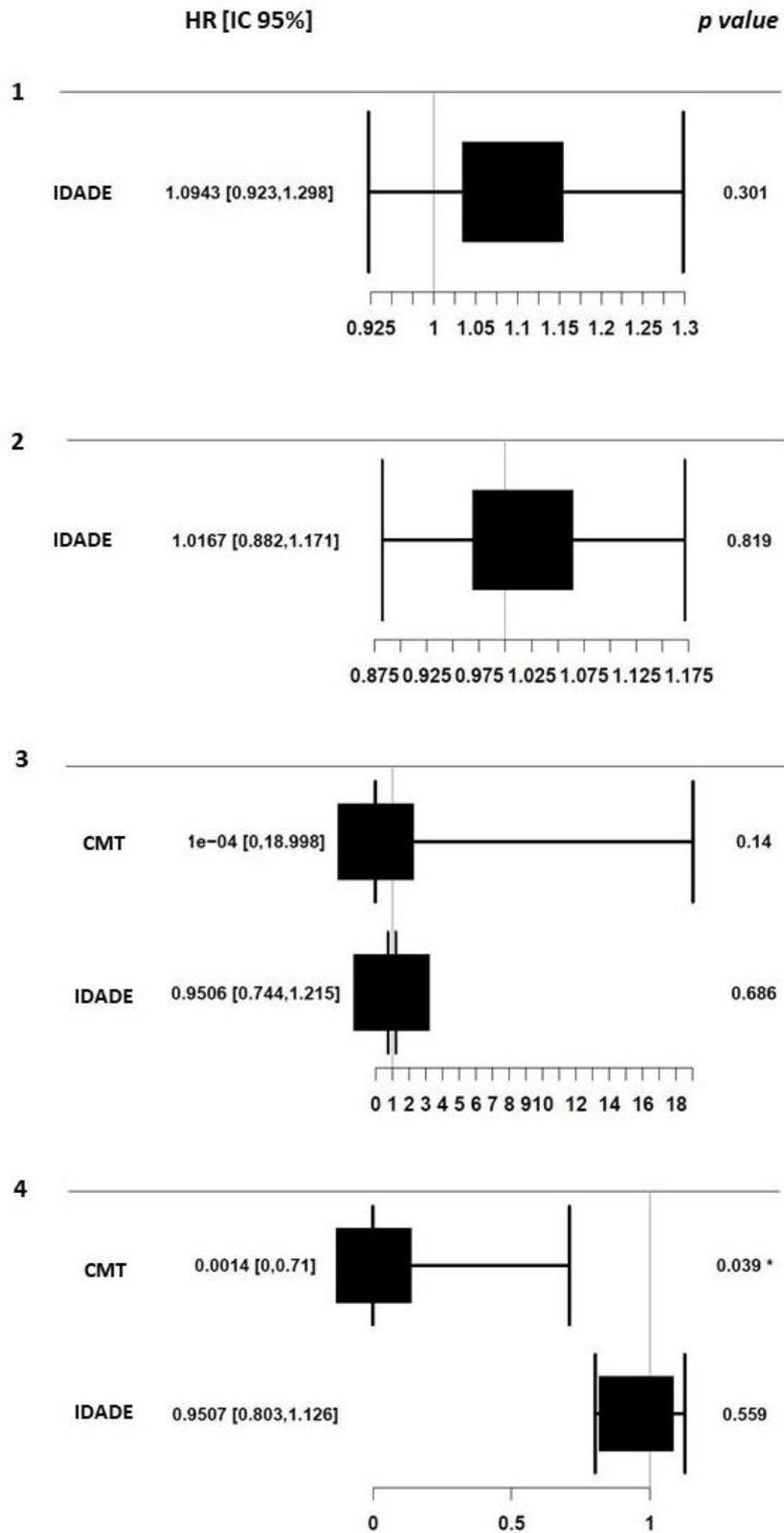


**Figura 15** – Testes de correlação entre as assinaturas SigneR.S2 (S2) e SigneR.S3 (S3) e a idade no grupo MSI+. A. Exposição diferencial das assinaturas S2 e S3 no grupo MSI+. B. Correlação de acordo com valor mediano do coeficiente de Spearman (*Spearman's rho*) das assinaturas S2 e S3 e idade.



$p\text{ value} = 7.153e-05$

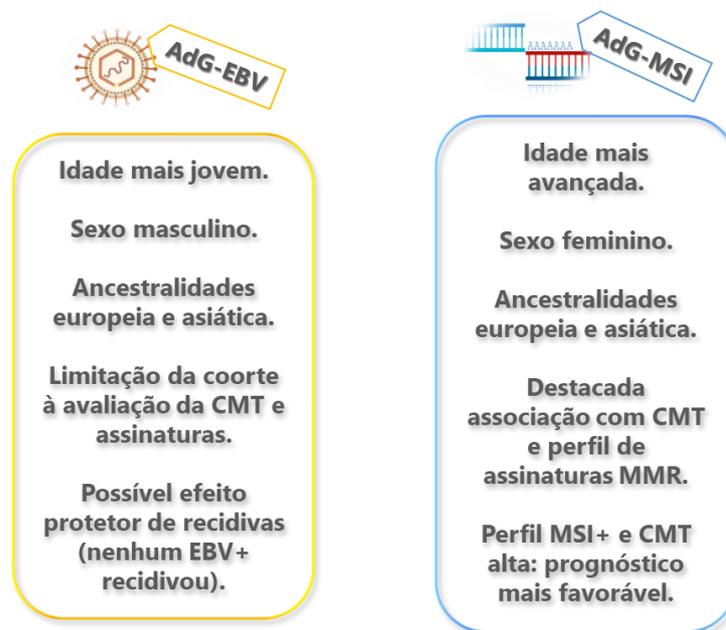
**Figura 16** - Histograma: relação da idade no AdG-MSI.



**Figura 17** – Testes de Log-Rank em relação a idade e CMT no grupo MSI+. Fatores: 1 e 2- idade, 3 e 4- idade e CMT/MB em log. Sobrevidas em 5 anos: 1 e 3- câncer específica, 2 e 4- livre de recidiva. HR: Hazard Ratio (taxa de risco). IC: intervalo de confiança de 95%. CMT: Carga mutacional tumoral. \**p value* <0,05.

## 5. CONCLUSÃO

Este trabalho se propôs a investigar as características clínico-moleculares do AdG-EBV e AdG-MSI e principalmente entender as suas relações com o prognóstico destes subtipos. Para assim contribuir com o manejo dos pacientes de AdG e permitir uma melhor compreensão no cenário da população brasileira, que é diversa e carece de investigações mais aprofundadas considerando suas peculiaridades. As prevalências de EBV e MSI aqui identificadas são condizentes com a literatura, bem como as características histopatológicas e moleculares de cada subtipo tumoral descritas no esquema a seguir:



Quanto à ancestralidade molecularmente determinada dessa população, observamos uma predominância europeia, seguida da asiática, principalmente no grupo EBV+. O perfil molecular incluiu também a CMT e as assinaturas mutacionais, onde o grupo MSI+ teve destaque nos resultados pela associação do status MSI com maior CMT e o correspondente perfil de assinaturas mutacionais.

Quanto ao prognóstico, os resultados sugerem que a presença de EBV parece ter um efeito protetor no que se refere às recidivas dos pacientes, pois nenhum caso EBV+ recidivou durante o seguimento avaliado. Os casos AdG-MSI se destacam do restante da coorte quanto aos pacientes com positividade para MSI & CMT alta, os quais apresentaram um prognóstico mais favorável.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [Internet]. novembro de 2018 [citado 11 de março de 2020];68(6):394–424. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>
2. Cancer today [Internet]. [citado 27 de abril de 2020]. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/today/home>
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 1º de março de 2015;136(5):E359-386.
4. Stomach (Gastric) Cancer Key Statistics [Internet]. [citado 23 de fevereiro de 2022]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/about/key-statistics.html>
5. Câncer de estômago [Internet]. INCA - Instituto Nacional de Câncer. 2018 [citado 16 de janeiro de 2022]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-estomago>
6. Estatísticas de câncer [Internet]. INCA - Instituto Nacional de Câncer. 2018 [citado 15 de julho de 2019]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>
7. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Fourth Edition - WHO - OMS - [Internet]. [citado 11 de março de 2020]. Disponível em: <https://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4003>
8. Lauren 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.
9. Câncer Gástrico Hospital Federal Cardoso Fontes - ppt video online carregar [Internet]. [citado 28 de março de 2022]. Disponível em: <https://slideplayer.com.br/slide/380896/>
10. CÂNCER GÁSTRICO PRECOCE - ppt carregar [Internet]. [citado 28 de março de 2022]. Disponível em: <https://slideplayer.com.br/slide/3044456/>

11. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* [Internet]. setembro de 2014 [citado 27 de abril de 2020];513(7517):202–9. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature13480>
12. Nakamura Y, Kawazoe A, Lordick F, Janjigian YY, Shitara K. Biomarker-targeted therapies for advanced-stage gastric and gastro-oesophageal junction cancers: an emerging paradigm. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. agosto de 2021 [citado 23 de fevereiro de 2022];18(8):473–87. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41571-021-00492-2>
13. Fukayama M, Abe H, Kunita A, Shinozaki-Ushiku A, Matsusaka K, Ushiku T, et al. Thirty years of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Virchows Arch* [Internet]. 13 de dezembro de 2019 [citado 11 de março de 2020]; Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00428-019-02724-4>
14. Saito M, Kono K. Landscape of EBV-positive gastric cancer. *Gastric Cancer* [Internet]. setembro de 2021 [citado 23 de fevereiro de 2022];24(5):983–9. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s10120-021-01215-3>
15. Xie T, Liu Y, Zhang Z, Zhang X, Gong J, Qi C, et al. Positive Status of Epstein-Barr Virus as a Biomarker for Gastric Cancer Immunotherapy: A Prospective Observational Study. *J Immunother*. 2020;00(00):6.
16. Kohlruss M, Grosser B, Krenauer M, Slotta-Huspenina J, Jesinghaus M, Blank S, et al. Prognostic implication of molecular subtypes and response to neoadjuvant chemotherapy in 760 gastric carcinomas: role of Epstein–Barr virus infection and high- and low-microsatellite instability. *J Pathol Clin Res* [Internet]. outubro de 2019 [citado 21 de abril de 2020];5(4):227–39. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cjp2.137>
17. Baudrin LG, Deleuze JF, How-Kit A. Molecular and Computational Methods for the Detection of Microsatellite Instability in Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 12 de dezembro de 2018 [citado 21 de abril de 2020];8:621. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00621/full>
18. Bonneville R, Krook MA, Kautto EA, Miya J, Wing MR, Chen HZ, et al. Landscape of Microsatellite Instability Across 39 Cancer Types. *JCO Precision Oncology* [Internet].

- novembro de 2017 [citado 21 de abril de 2020];(1):1–15. Disponível em: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/PO.17.00073>
19. Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, Salipante SJ. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med* [Internet]. novembro de 2016 [citado 21 de abril de 2020];22(11):1342–50. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nm.4191>
  20. Imunoterapia: Quando é indicada? [Internet]. Especialista em tratamento de câncer. 2020 [citado 4 de outubro de 2022]. Disponível em: <https://drmarcelocruz.com.br/blog/quando-imunoterapia-e-indicada/>
  21. O que a imunoterapia tem a dizer sobre o tratamento de câncer? - Centro de Oncologia - CEON+ [Internet]. 2017 [citado 4 de outubro de 2022]. Disponível em: <https://oncologiaabc.com.br/imunoterapia/>
  22. Oncocenter C. Câncer de estômago: quais seus tipos e tratamentos? - Oncocenter [Internet]. Oncologia em São Paulo. 2020 [citado 5 de setembro de 2022]. Disponível em: <https://oncocentermedicos.com.br/cancer-de-estomago-quais-seus-tipos-e-tratamentos/>
  23. Oncoguia I. Inibidores do Controle Imunológico para Tratamento do Câncer [Internet]. Instituto Oncoguia. [citado 5 de julho de 2022]. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/inibidores-imunologicos/7962/922/>
  24. Oncoguia I. Tratamento para Câncer de Estômago por Estágio [Internet]. Instituto Oncoguia. [citado 5 de setembro de 2022]. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamento-para-cancer-de-estomago-por-estagio/5614/275/>
  25. Victor F. Câncer gástrico: como deve ser a abordagem cirúrgica? [Internet]. PEBMED. 2022 [citado 5 de setembro de 2022]. Disponível em: <https://pebmed.com.br/cancer-gastrico-como-deve-ser-a-abordagem-cirurgica/>
  26. Puliga E, Corso S, Pietrantonio F, Giordano S. Microsatellite instability in Gastric Cancer: Between lights and shadows. *Cancer Treatment Reviews* [Internet]. abril de 2021 [citado 23 de fevereiro de 2022];95:102175. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305737221000232>

27. da Silva EM, Fernandes MR, de Carvalho DC, Leitao LPC, Cavalcante GC, Pereira EEB, et al. Effect of genetic ancestry to the risk of susceptibility to gastric cancer in a mixed population of the Brazilian Amazon. *BMC Res Notes* [Internet]. dezembro de 2017 [citado 23 de fevereiro de 2022];10(1):646. Disponível em: <https://bmresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-017-2963-4>
28. Bartelli TF, Senda de Abrantes LL, Freitas HC, Thomas AM, Silva JM, Albuquerque GE, et al. Genomics and epidemiology for gastric adenocarcinomas (GE4GAC): a Brazilian initiative to study gastric cancer. *Applied Cancer Research* [Internet]. 22 de outubro de 2019 [citado 24 de junho de 2020];39(1):12. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s41241-019-0081-4>
29. Abdel-Rahman O. Asian Americans have better outcomes of non-metastatic gastric cancer compared to other United States racial groups: A secondary analysis from a randomized study. *WJGO* [Internet]. 15 de dezembro de 2019 [citado 23 de fevereiro de 2022];11(12):1151–60. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1948-5204/full/v11/i12/1151.htm>
30. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*. 10 de maio de 2006;24(14):2137–50.
31. Fukayama M. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma: EBV and gastric carcinoma. *Pathology International* [Internet]. 29 de abril de 2010 [citado 11 de março de 2020];60(5):337–50. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1827.2010.02533.x>
32. Kim J, Sun CL, Mailey B, Prendergast C, Artinyan A, Bhatia S, et al. Race and ethnicity correlate with survival in patients with gastric adenocarcinoma. *Ann Oncol*. janeiro de 2010;21(1):152–60.
33. Miceli R, An J, Di Bartolomeo M, Morano F, Kim ST, Park SH, et al. Prognostic Impact of Microsatellite Instability in Asian Gastric Cancer Patients Enrolled in the ARTIST Trial. *OCL* [Internet]. 2019 [citado 27 de abril de 2020];97(1):38–43. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/499628>

34. Engstrand L, Graham DY. Microbiome and Gastric Cancer. *Dig Dis Sci* [Internet]. março de 2020 [citado 11 de abril de 2020];65(3):865–73. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10620-020-06101-z>
35. Burke AP, Yen TS, Shekitka KM, Sobin LH. Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Mod Pathol*. maio de 1990;3(3):377–80.
36. Wu TC, Mann RB, Charache P, Hayward SD, Staal S, Lambe BC, et al. Detection of EBV gene expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Int J Cancer*. 15 de novembro de 1990;46(5):801–4.
37. Wang Q, Liu G, Hu C. Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma. *Gastroenterol Res* [Internet]. 2019 [citado 21 de abril de 2020];12(6):275–82. Disponível em: <http://www.gastrores.org/index.php/Gastrores/article/view/1187>
38. Moore A, Hikri E, Goshen-Lago T, Barkan T, Morgenstern S, Brook E, et al. Young-onset gastric cancer and Epstein-Barr Virus (EBV) – a major player in the pathogenesis? *BMC Cancer* [Internet]. dezembro de 2020 [citado 11 de março de 2020];20(1):34. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-020-6517-0>
39. Young LS, Yap LF, Murray PG. Epstein-Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(12):789–802.
40. Nakayama A, Abe H, Kunita A, Saito R, Kanda T, Yamashita H, et al. Viral loads correlate with upregulation of PD-L1 and worse patient prognosis in Epstein-Barr Virus-associated gastric carcinoma. *PLoS ONE*. 2019;14(1):e0211358.
41. Ajani JA, Lee J, Sano T, Janjigian YY, Fan D, Song S. Gastric adenocarcinoma. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. dezembro de 2017 [citado 12 de abril de 2020];3(1):17036. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrdp201736>
42. Kaneda A, Matsusaka K, Aburatani H, Fukayama M. Epstein-Barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis. *Cancer Res*. 15 de julho de 2012;72(14):3445–50.

43. Song HJ, Srivastava A, Lee J, Kim YS, Kim KM, Ki Kang W, et al. Host inflammatory response predicts survival of patients with Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Gastroenterology*. julho de 2010;139(1):84-92.e2.
44. Bobrovnitchaia I, Valieris R, Drummond RD, Lima JP, Freitas HC, Bartelli TF, et al. APOBEC-mediated DNA alterations: A possible new mechanism of carcinogenesis in EBV-positive gastric cancer. *International Journal of Cancer* [Internet]. 2020 [citado 11 de agosto de 2021];146(1):181–91. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.32411>
45. Freitas HC. Avaliação do perfil de mutações somáticas em uma coorte de pacientes com adenocarcinoma gástrico. 2019. Tese de Doutorado em Oncologia. A.C.Camargo Cancer Center.
46. Jing J jing, Li H, Wang Z yang, Zhou H, Sun L ping, Yuan Y. Aberrantly methylated-differentially expressed genes and pathways in Epstein–Barr virus-associated gastric cancer. *Future Oncology* [Internet]. fevereiro de 2020 [citado 11 de março de 2020];16(6):187–97. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fon-2019-0649>
47. A potential EBV-related classifier is associated with the efficacy of immunotherapy in gastric cancer - PMC [Internet]. [citado 4 de outubro de 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9372194/>
48. Li W, He C, Wu J, Yang D, Yi W. Epstein barr virus encodes miRNAs to assist host immune escape. *J Cancer* [Internet]. 2020 [citado 11 de março de 2020];11(8):2091–100. Disponível em: <http://www.jcancer.org/v11p2091.htm>
49. Ichimura T, Abe H, Morikawa T, Yamashita H, Ishikawa S, Ushiku T, et al. Low density of CD204-positive M2-type tumor-associated macrophages in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: a clinicopathologic study with digital image analysis. *Hum Pathol*. 2016;56:74–80.
50. Koh J, Ock CY, Kim JW, Nam SK, Kwak Y, Yun S, 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*. 18 de abril de 2017;8(16):26356–67.

51. Cho J, Chang YH, Heo YJ, Kim S, Kim NK, Park JO, et al. Four distinct immune microenvironment subtypes in gastric adenocarcinoma with special reference to microsatellite instability. *ESMO Open* [Internet]. março de 2018 [citado 21 de abril de 2020];3(3):e000326. Disponível em: <http://esmoopen.bmj.com/lookup/doi/10.1136/esmoopen-2018-000326>
52. Morihiro T, Kuroda S, Kanaya N, Kakiuchi Y, Kubota T, Aoyama K, et al. PD-L1 expression combined with microsatellite instability/CD8+ tumor infiltrating lymphocytes as a useful prognostic biomarker in gastric cancer. *Sci Rep* [Internet]. 15 de março de 2019 [citado 23 de fevereiro de 2022];9(1):4633. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-41177-2>
53. Kim ST, Cristescu R, Bass AJ, Kim KM, Odegaard JI, Kim K, et al. Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer. *Nat Med*. 2018;24(9):1449–58.
54. Stanek L, Gurlich R, Musil Z, Havluj L, Whitley A. Monitoring EBV infection, MSI, PDL-1 expression, Her-2/neu amplification as a biomarker for PD-1 inhibition in gastric cancer. *Bratisl Lek Listy*. 2022;123(2):83–6.
55. Classification of Epstein–Barr Virus–Positive Gastric Cancers by Definition of DNA Methylation Epigenotypes | *Cancer Research* [Internet]. [citado 27 de abril de 2020]. Disponível em: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/71/23/7187>
56. Zhu L, Huang Y, Fang X, Liu C, Deng W, Zhong C, et al. A Novel and Reliable Method to Detect Microsatellite Instability in Colorectal Cancer by Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn*. março de 2018;20(2):225–31.
57. Johansen AFB, Kassentoft CG, Knudsen M, Laursen MB, Madsen AH, Iversen LH, et al. Validation of computational determination of microsatellite status using whole exome sequencing data from colorectal cancer patients. *BMC Cancer* [Internet]. 21 de outubro de 2019 [citado 10 de agosto de 2021];19(1):971. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6227-7>
58. Salipante SJ, Scroggins SM, Hampel HL, Turner EH, Pritchard CC. Microsatellite Instability Detection by Next Generation Sequencing. *Clinical Chemistry* [Internet]. 1º de

- setembro de 2014 [citado 10 de agosto de 2021];60(9):1192–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.223677>
59. Park JH, Kim EK, Kim YH, Kim JH, Bae YS, Lee YC, et al. Epstein-Barr virus positivity, not mismatch repair-deficiency, is a favorable risk factor for lymph node metastasis in submucosa-invasive early gastric cancer. *Gastric Cancer*. outubro de 2016;19(4):1041–51.
60. Barbi S, Cataldo I, Manzoni GD, Bersani S, Lamba S, Mattuzzi S, et al. RTehsearchanalysis of PIK3CA mutations in gastric carcinoma and metanalysis of literature suggest that exon-selectivity is a signature of cancer type. *Clinical Cancer Research*. 2010;8.
61. Polom K, Marano L, Marrelli D, De Luca R, Roviello G, Savelli V, et al. Meta-analysis of microsatellite instability in relation to clinicopathological characteristics and overall survival in gastric cancer. *Br J Surg*. fevereiro de 2018;105(3):159–67.
62. Chiaravalli AM, Feltri M, Bertolini V, Bagnoli E, Furlan D, Cerutti R, et al. Intratumour T cells, their activation status and survival in gastric carcinomas characterised for microsatellite instability and Epstein–Barr virus infection. *Virchows Arch [Internet]*. 1º de março de 2006 [citado 23 de fevereiro de 2022];448(3):344–53. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00428-005-0066-4>
63. Carrascal E, Koriyama C, Akiba S, Tamayo O, Itoh T, Eizuru Y, et al. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Cali, Colombia. *Oncol Rep*. agosto de 2003;10(4):1059–62.
64. Pietrantonio F, Randon G, Di Bartolomeo M, Luciani A, Chao J, Smyth EC, et al. Predictive role of microsatellite instability for PD-1 blockade in patients with advanced gastric cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. *ESMO Open [Internet]*. fevereiro de 2021 [citado 23 de fevereiro de 2022];6(1):100036. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2059702920329021>
65. Bashash M, Hislop TG, Shah AM, Le N, Brooks-Wilson A, Bajdik CD. The prognostic effect of ethnicity for gastric and esophageal cancer: the population-based experience in British Columbia, Canada. *BMC Cancer [Internet]*. 9 de maio de 2011 [citado 27 de abril de 2020];11:164. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3112158/>

66. Merchant SJ, Li L, Kim J. Racial and ethnic disparities in gastric cancer outcomes: More important than surgical technique? *World J Gastroenterol* [Internet]. 7 de setembro de 2014 [citado 27 de abril de 2020];20(33):11546–51. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4155347/>
67. Koriyama C, Akiba S, Iriya K, Yamaguti T, Hamada GS, Itoh T, et al. Epstein-Barr Virus-associated Gastric Carcinoma in Japanese Brazilians and Non-Japanese Brazilians in São Paulo. *Japanese Journal of Cancer Research* [Internet]. setembro de 2001 [citado 6 de setembro de 2022];92(9):911–7. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2001.tb01180.x>
68. Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN, Kumar V. *Robbins Patologia Basica*. Elsevier Brasil; 2008. 1048 p.
69. Koriyama C, Akiba S, Minakami Y, Eizuru Y. Environmental factors related to Epstein-Barr virus-associated gastric cancer in Japan. *J Exp Clin Cancer Res*. dezembro de 2005;24(4):547–53.
70. Hao Z, Koriyama C, Akiba S, Li J, Luo X, Itoh T, et al. The Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Southern and Northern China. *Oncol Rep*. dezembro de 2002;9(6):1293–8.
71. Corvalán A, Ruedlinger J, de Mayo T, Polakovicova I, Gonzalez-Hormazabal P, Aguayo F. The Phylogeographic Diversity of EBV and Admixed Ancestry in the Americas—Another Model of Disrupted Human-Pathogen Co-Evolution. *Cancers* [Internet]. 14 de fevereiro de 2019 [citado 23 de fevereiro de 2022];11(2):217. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2072-6694/11/2/217>
72. Percy CL, *Weltgesundheitsorganisation, organizadores*. *Classificação internacional de doenças para oncologia: CID-O*. 2. ed. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo; 1996. 112 p.
73. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM [Internet]. arXiv; 2013 maio [citado 2 de junho de 2022]. Report No.: arXiv:1303.3997. Disponível em: <http://arxiv.org/abs/1303.3997>

74. Takenaka IKTM, Bartelli TF, Defelicibus A, Sendoya JM, Golubicki M, Robbio J, et al. Exome and Tissue-Associated Microbiota as Predictive Markers of Response to Neoadjuvant Treatment in Locally Advanced Rectal Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 22 de março de 2022 [citado 2 de junho de 2022];12:809441. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.809441/full>
75. Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat.* julho de 2017;38(7):751–63.
76. MSIseq: Software for Assessing Microsatellite Instability from Catalogs of Somatic Mutations. - Abstract - Europe PMC [Internet]. [citado 24 de junho de 2020]. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/26306458>
77. HaplotypeCaller [Internet]. GATK. [citado 13 de maio de 2022]. Disponível em: <https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360037225632-HaplotypeCaller>
78. Oliveira FDA. IMPACTO DA ANCESTRALIDADE NA PROGRESSÃO E BIOLOGIA DO MELANOMA E CARCINOMA DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS. 2021. Dissertação de Mestrado em Oncologia. A.C.Camargo Cancer Center.
79. Buttura JR, Provisor MN, Valieris R, Calsavara VF, Drummond RD, Defelicibus A, et al. Mutational signatures driven by epigenetic determinants stratify patients for therapeutic interventions in gastric cancer. *medRxiv* [Internet]. 22 de abril de 2020 [citado 24 de junho de 2020];2020.04.17.20066944. Disponível em: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.17.20066944v1>
80. tmb: Estimate Tumor Mutation Burden in maftools: Summarize, Analyze and Visualize MAF Files [Internet]. [citado 26 de novembro de 2022]. Disponível em: <https://rdr.io/bioc/maftools/man/tmb.html>
81. Cosmic. COSMIC - Catalogue of Somatic Mutations in Cancer [Internet]. [citado 5 de setembro de 2022]. Disponível em: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
82. Hirabayashi M, Georges D, Clifford GM, de Martel C. Estimating the global burden of Epstein-Barr virus associated gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* [Internet]. agosto de 2022 [citado 21 de agosto

- de 2022];S1542356522007649. Disponível em:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542356522007649>
83. Trimeche M, Ksiâa F, Ziadi S, Mestiri S, Hachana M, Gacem RB, et al. Prevalence and characteristics of Epstein–Barr virus-associated gastric carcinomas in Tunisia: *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* [Internet]. setembro de 2009 [citado 11 de março de 2020];21(9):1001–7. Disponível em: <http://journals.lww.com/00042737-200909000-00007>
84. Mathiak M, Warneke VS, Behrens HM, Haag J, Böger C, Krüger S, et al. Clinicopathologic Characteristics of Microsatellite Instable Gastric Carcinomas Revisited: Urgent Need for Standardization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* [Internet]. janeiro de 2017 [citado 15 de maio de 2022];25(1):12–24. Disponível em:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5147042/>
85. Sadato D, Ogawa M, Hirama C, Hishima T, Horiguchi S, Harada Y, et al. Potential prognostic impact of EBV RNA-seq reads in gastric cancer: a reanalysis of The Cancer Genome Atlas cohort. *FEBS Open Bio* [Internet]. março de 2020 [citado 11 de março de 2020];10(3):455–67. Disponível em:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/2211-5463.12803>
86. Zhou Q, Tao F, Qiu L, Chen H, Bao H, Wu X, et al. Somatic Alteration Characteristics of Early-Onset Gastric Cancer. Granito A, organizador. *Journal of Oncology* [Internet]. 22 de abril de 2022 [citado 27 de maio de 2022];2022:1–11. Disponível em:  
<https://www.hindawi.com/journals/jo/2022/1498053/>
87. Rihane FE, Erguibi D, Elyamine O, Abumsimir B, Ennaji MM, Chehab F. *Helicobacter pylori* co-infection with Epstein-Barr virus and the risk of developing gastric adenocarcinoma at an early age: Observational study infectious agents and cancer. *Annals of Medicine and Surgery* [Internet]. 1º de agosto de 2021 [citado 27 de maio de 2022];68:102651. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2049080121006014>
88. Peter S, Beglinger C. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: The Causal Relationship. *DIG* [Internet]. 2007 [citado 27 de maio de 2022];75(1):25–35. Disponível em:  
<https://www.karger.com/Article/FullText/101564>

89. Rigão MH, Moraes AB, Zanini RR. Análise de sobrevivência - Aplicação do modelo de regressão de Cox. *Ciência e Natura* [Internet]. 29 de dezembro de 2020 [citado 5 de junho de 2022];42:e20–e20. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/cienciaenatura/article/view/40480>
90. Bustamante-Teixeira MT, Faerstein E, Latorre M do R. Técnicas de análise de sobrevida. *Cad Saúde Pública* [Internet]. junho de 2002 [citado 5 de junho de 2022];18(3):579–94. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X2002000300003&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2002000300003&lng=pt&tlng=pt)
91. Pereira MA, Ramos MFKP, Faraj SF, Dias AR, Yagi OK, Zilberstein B, et al. Clinicopathological and prognostic features of Epstein-Barr virus infection, microsatellite instability, and PD-L1 expression in gastric cancer. *Journal of Surgical Oncology* [Internet]. 2018 [citado 21 de agosto de 2022];117(5):829–39. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jso.25022>
92. de Fátima Aquino Moreira-Nunes C, de Souza Almeida Titan Martins CN, Feio D, Lima IK, Lamarão LM, de Souza CRT, et al. PD-L1 Expression Associated with Epstein—Barr Virus Status and Patients’ Survival in a Large Cohort of Gastric Cancer Patients in Northern Brazil. *Cancers* [Internet]. 22 de junho de 2021 [citado 30 de agosto de 2022];13(13):3107. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/13/3107>
93. Liu X, Choi MG, Kim K, Kim KM, Kim ST, Park SH, et al. High PD-L1 expression in gastric cancer (GC) patients and correlation with molecular features. *Pathology - Research and Practice* [Internet]. fevereiro de 2020 [citado 11 de março de 2020];152881. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0344033819328171>
94. Choi E, Chang MS, Byeon S ju, Jin H, Jung KC, Kim H, et al. Prognostic perspectives of PD-L1 combined with tumor-infiltrating lymphocytes, Epstein-Barr virus, and microsatellite instability in gastric carcinomas. *Diagn Pathol* [Internet]. dezembro de 2020 [citado 21 de agosto de 2022];15(1):69. Disponível em: <https://diagnosticpathology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13000-020-00979-z>
95. Campanella NC, Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, Viana D, Palmero EI, Pereira R, et al. Optimization of a pentaplex panel for MSI analysis without control DNA in a Brazilian population: correlation with ancestry markers. *Eur J Hum Genet* [Internet]. julho

- de 2014 [citado 23 de fevereiro de 2022];22(7):875–80. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ejhg2013256>
96. Karalis JD, Ju MR, Mansour JC, Polanco PM, Yopp AC, Zeh HJ, et al. The presentation of Hispanic gastric cancer patients varies by location of patient ancestry. *J Surg Oncol* [Internet]. dezembro de 2021 [citado 23 de fevereiro de 2022];124(7):1051–9. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jso.26609>
97. Camila Drumond MUZI. TREND OF MORTALITY RATES FOR GASTRIC CANCER IN BRAZIL AND REGIONS IN THE PERIOD OF 30 YEARS (1980-2009).
98. Pereira L, Zamudio R, Soares-Souza G, Herrera P, Cabrera L, Hooper CC, et al. Socioeconomic and Nutritional Factors Account for the Association of Gastric Cancer with Amerindian Ancestry in a Latin American Admixed Population. Xu Z, organizador. *PLoS ONE* [Internet]. 3 de agosto de 2012 [citado 23 de fevereiro de 2022];7(8):e41200. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0041200>
99. Zhou C, Chen S, Xu F, Wei J, Zhou X, Wu Z, et al. Estimating tumor mutational burden across multiple cancer types using whole-exome sequencing. *Ann Transl Med* [Internet]. setembro de 2021 [citado 26 de novembro de 2022];9(18):1437–1437. Disponível em: <https://atm.amegroups.com/article/view/79677/html>
100. Mayakonda A, Lin DC, Assenov Y, Plass C, Koeffler HP. Maftools: efficient and comprehensive analysis of somatic variants in cancer. *Genome Res* [Internet]. novembro de 2018 [citado 26 de novembro de 2022];28(11):1747–56. Disponível em: <http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.239244.118>
101. Klempner SJ, Fabrizio D, Bane S, Reinhart M, Peoples T, Ali SM, et al. Tumor Mutational Burden as a Predictive Biomarker for Response to Immune Checkpoint Inhibitors: A Review of Current Evidence. *The Oncologist* [Internet]. 1º de janeiro de 2020 [citado 26 de novembro de 2022];25(1):e147–59. Disponível em: <https://academic.oup.com/oncolo/article/25/1/e147/6443315>
102. Yuza K, Nagahashi M, Watanabe S, Takabe K, Wakai T. Hypermutation and microsatellite instability in gastrointestinal cancers. *Oncotarget* [Internet]. 19 de dezembro de 2017 [citado 26 de novembro de 2022];8(67):112103–15. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.22783>

103. Palmeri M, Mehnert J, Silk AW, Jabbour SK, Ganesan S, Popli P, et al. Real-world application of tumor mutational burden-high (TMB-high) and microsatellite instability (MSI) confirms their utility as immunotherapy biomarkers. *ESMO Open* [Internet]. fevereiro de 2022 [citado 27 de novembro de 2022];7(1):100336. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2059702921002982>
104. COSMIC | SBS - Mutational Signatures [Internet]. [citado 16 de outubro de 2022]. Disponível em: <https://cancer.sanger.ac.uk/signatures/sbs/>

***“Tudo na vida é 90% força de vontade”.***

***Vera Batista, minha mãe.***



FUNDAÇÃO ANTÔNIO  
PRUDENTE - A.C. CAMARGO  
CANCER CENTER



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Impacto do status da infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) e do perfil de instabilidade de microsátélites (MSI) no prognóstico de pacientes portadores de adenocarcinomas gástricos.

**Pesquisador:** Emmanuel Dias-Neto

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 1

**CAAE:** 50935221.5.0000.5432

**Instituição Proponente:** FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.003.859

#### Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos itens "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa", "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do documento "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1809754.pdf", gerado pela Plataforma Brasil em 18/08/2021 e do documento "Final\_13\_08\_21\_Projeto\_Mestrado\_Luana.pdf" anexado a PB em 16/08/2021.

### INTRODUÇÃO

A definição de tumores que tenham melhor prognóstico, ou que possam ser submetidos a terapias específicas ainda é um desafio no tratamento oncológico moderno. Dentre os adenocarcinomas gástricos (AdGs), dois subtipos moleculares parecem apresentar melhor prognóstico quando comparados aos demais, além de serem candidatos à imunoterapia. Tais subtipos são caracterizados pela presença do vírus Epstein-Barr (AdGEBV) ou pela instabilidade de microsátélites de DNA (AdG-MSI), havendo indicações de que tais subtipos sejam mutuamente exclusivos. No Brasil, os fatores envolvidos no desenvolvimento e no desfecho de casos AdG-EBV e AdG-MSI carecem de maiores investigações, principalmente ao considerarmos as características epidemiológicas e de diversidade étnica próprias desta população. Neste projeto analisaremos a

**Endereço:** Rua Professor Antônio Prudente, 211

**Bairro:** Liberdade

**CEP:** 01.509-900

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2189-5020

**Fax:** (11)2189-5020

**E-mail:** cep\_accamargo@accamargo.org.br

Continuação do Parecer: 5.003.859

prevalência de EBV e o status de MSI, em uma coorte de pacientes portadores de AdG recrutados na vigência de projeto temático institucional que avalia aspectos epidemiológicos e genômicos do AdG no Brasil, buscando determinar sua relevância prognóstica. Avaliaremos a prevalência de EBV+ através de PCR em tempo real em amostras gástricas, enquanto o status de MSI será determinado pelo material tumoral da biópsia a partir de sequenciamento de exoma (softwares MSIseq & NGSclassifier). A presença de ambos marcadores será correlacionada ao prognóstico tumoral, levando-se em conta ainda aspectos tais como localização do tumor na cavidade gástrica, estadiamento patológico e cirúrgico e assinaturas mutacionais, além da etnia a ser determinada pelo estudo de marcadores genômicos de ancestralidade (AIMs – Ancestry Informative Markers) determinados a partir dos dados de exoma. Deste modo, esperamos contribuir para a melhor compreensão do papel destes marcadores na malignidade do câncer gástrico em pacientes de nossa coorte.

#### Hipótese:

Além da tradicional classificação histopatológica, os tumores gástricos também podem ser classificados em subtipos moleculares influenciados por alterações genéticas específicas, dentre eles, os subtipos EBV+ e MSI+. Infelizmente, a aplicação prática destas classificações no manejo do paciente ainda é limitada devido à escassez de dados robustos que os associem de forma definitiva as características clínico-patológicas dos pacientes e respostas terapêuticas a dados moleculares tumorais que ajudem na estratificação dos pacientes e melhor entendimento do desenvolvimento e desfecho da doença. De modo particular no que se refere à resposta a diferentes regimes terapêuticos, a literatura ainda é divergente sobre esses dois subtipos moleculares, pois diversos fatores influenciam no resultado clínico, como por exemplo as alterações genéticas e contextos de ancestralidade que estão por trás do desenvolvimento e progressão do AdG. Neste trabalho, pretendemos determinar a prevalência dos subtipos AdG-EBV+ e AdG-MSI+ em uma coorte brasileira, e avaliar o perfil molecular e papel desses fatores na progressão da doença, em um contexto de ancestralidade genômica, visando promover o melhor manejo dos pacientes no futuro.

#### Metodologia Proposta:

As amostras de biópsia tecidual e fluidos gástricos são coletadas durante o procedimento endoscópico de diagnóstico. Antes do procedimento, os pacientes são instruídos, entre outras recomendações, a realizarem um jejum líquido e sólido de pelo menos 8 horas. Inicialmente, o

**Endereço:** Rua Professor Antônio Prudente, 211

**Bairro:** Liberdade

**CEP:** 01.509-900

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2189-5020

**Fax:** (11)2189-5020

**E-mail:** cep\_accamargo@accamargo.org.br

Continuação do Parecer: 5.003.859

estômago dos pacientes é lavado, e este fluido gástrico, que seria descartado durante o procedimento, é coletado (até 50ml) e processado, o que inclui aferição do pH e neutralização (quando necessário), seguido de armazenamento a -20°C. As biópsias são coletadas e armazenadas pelo Biobanco da instituição.

Uma vez que os fluídos gástricos têm contato direto com diversas regiões da mucosa estomacal, avaliaremos se eles podem ser mais representativos que as biópsias na detecção viral, sendo estas limitadas a uma determinada região e sujeitas a viés de representatividade. Até o momento, já avaliamos o status EBV para 120 biópsias e 110 amostras de fluidos gástricos. Determinação do status de MSI, carga mutacional tumoral e ancestralidade genômica. Para análise de instabilidade de microssatélites avaliaremos o status MSI pelo software MSIseq (52) nos dados provenientes do sequenciamento de exomas com o auxílio do grupo de Bioinformática e Biologia Computacional do ACCCC, liderado pelo Dr. Israel Tojal. Para determinar uma possível associação da carga mutacional tumoral (CMT) com os subtipos EBV e MSI de AdG, e com as características clínicas da coorte, avaliaremos a CMT como previamente descrito (53) também com o auxílio do grupo de Bioinformática e Biologia Computacional do ACCCC. Até o momento, temos dentro do projeto temático 170 exomas (provenientes de biópsias tumorais) sequenciados nas plataformas HiSeq4000 (100pb, n=33) e Novaseq (150bp, n=137). O status MSI (High ou Non-MSI-High) e a CMT já foram definidos para algumas destas amostras (54) e as demais serão acrescentadas durante a realização deste projeto. Para inferir a ancestralidade genômica predominante, utilizaremos um conjunto de 120 mil SNPs (do inglês “Single Nucleotide Polymorphisms”) indicativos de ancestralidade, chamados MIA - marcadores informativos de ancestralidade (do inglês AIMs – Ancestry Informative Markers), os quais foram determinados em nove populações de referências por ELHAIK et al. (2014). Tais SNPs serão buscados em sequências on-target e off-target provenientes do sequenciamento dos exomas dos pacientes com AdG já mencionados anteriormente. Esta metodologia já foi testada e previamente estabelecida em nosso grupo.

#### Critério de Inclusão:

Os critérios de inclusão incluem pacientes de ambos os sexos, com idade superior a 30 anos, diagnosticados com AdG do tipo intestinal ou difuso (de acordo com exame histopatológico da biópsia coletada), sem histórico de diagnóstico e tratamento prévio relacionado à doença e que

**Endereço:** Rua Professor Antônio Prudente, 211

**Bairro:** Liberdade

**CEP:** 01.509-900

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2189-5020

**Fax:** (11)2189-5020

**E-mail:** cep\_accamargo@accamargo.org.br

Continuação do Parecer: 5.003.859

concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) do projeto a que este é afiliado.

**Critério de Exclusão:**

Foram excluídos pacientes com síndrome de câncer familiar que predispõe ao desenvolvimento de câncer gástrico, tais como a Síndrome Hereditária de Câncer de Cólon Não Polipoide (HNPCC), Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), Síndrome de Peutz-Jeghers e o câncer gástrico hereditário de tipo difuso (HDGC). E também aqueles participantes portadores de doenças mentais ou com dificuldades de entendimento dos procedimentos.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Objetivo geral: determinar frequência e a relevância prognóstica do status de MSI e EBV, associados a características clínicas e moleculares em uma coorte brasileira de pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico.

**Objetivo Secundário:**

**Objetivos específicos**

- I. Determinar a presença e a quantidade relativa de DNA de EBV em amostras gástricas visando classificar os pacientes nos subgrupos EBV+ ou EBV-, e correlacionar estes achados com características clínico-patológicas e moleculares;
- II. Determinar o status de instabilidade de microsátélites (MSI) em amostras tumorais a partir de dados de exoma, avaliando possíveis relações com características clinicopatológicas e moleculares encontradas;
- III. Avaliar, a partir de dados de exoma, a ancestralidade molecular dos pacientes incluídos no estudo, avaliando correlações desta com o status de MSI e EBV;
- IV. Calcular a carga de mutação tumoral a partir de dados de exoma, e avaliar sua correlação com a classificação das amostras nos grupos de EBV e MSI, assim como avaliar seu impacto no prognóstico;
- V. Avaliar possíveis diferenças de sobrevida entre pacientes positivos ou negativos para ambos marcadores (EBV e MSI).

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

De acordo com os pesquisadores:

**Endereço:** Rua Professor Antônio Prudente, 211

**Bairro:** Liberdade

**CEP:** 01.509-900

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2189-5020

**Fax:** (11)2189-5020

**E-mail:** cep\_accamargo@accamargo.org.br

Continuação do Parecer: 5.003.859

**Riscos:**

Por ser um projeto retrospectivo os riscos envolvem a manipulação das informações dos pacientes, portanto há risco mínimo de perda de confidencialidade. Os dados clínicos dos pacientes já se encontram no redcap (banco de dados) do projeto a que este é afiliado. Os pacientes são anonimizados para minizar este risco.

**Benefícios:**

Não há benefícios diretos ao pacientes como já esclarecido no TCLE assinados pelos mesmos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto retrospectivo.

Análise de material biológico já coletado no projeto temático (Genômica de Adenocarcinomas Gástricos 50523015.6.0000.5432).

Prevê inclusão de 212 participantes de pesquisa.

Termo de consentimento livre e esclarecido já assinado no projeto temático que originou este projeto atual.

Dados clínicos e epidemiológicos já inseridos no REDCap.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

**Recomendações:**

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não observamos óbices éticos após apreciação dos documentos apresentados.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O projeto em referência (registro CEP nº. 2134/15L) será desenvolvido por Luana Batista do Carmo dos Santos, aluna de Mestrado.

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

**Endereço:** Rua Professor Antônio Prudente, 211

**Bairro:** Liberdade

**CEP:** 01.509-900

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2189-5020

**Fax:** (11)2189-5020

**E-mail:** cep\_accamargo@accamargo.org.br

Continuação do Parecer: 5.003.859

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1809754.pdf	18/08/2021 11:24:25		Aceito
Outros	Carta_de_submissao_subprojeto.pdf	18/08/2021 11:23:24	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_do_TCLE_Projeto_Luana.pdf	18/08/2021 11:22:14	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Folha de Rosto	Folha_De_Rosto_Afiliado_Emmanuel_assinado.pdf	18/08/2021 11:17:58	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Final_13_08_21_Projeto_Mestrado_Luana.pdf	16/08/2021 11:41:36	Emmanuel Dias-Neto	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 28 de Setembro de 2021

---

**Assinado por:  
Sandra Caires Serrano  
(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Professor Antônio Prudente, 211**Bairro:** Liberdade**CEP:** 01.509-900**UF:** SP**Município:** SAO PAULO**Telefone:** (11)2189-5020**Fax:** (11)2189-5020**E-mail:** cep\_accamargo@accamargo.org.br



## Projeto: Genômica de Adenocarcinomas Gástrico

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Número do Protocolo: 2134/15
<b>Título do Estudo: Genômica de Adenocarcinomas Gástrico</b>
Nome completo do Pesquisador: Dr. Emmanuel Dias-Neto
Nome da Instituição: A.C. Camargo Cancer Center
Telefone do pesquisador: (11) 2189-5023

Nome do Participante: \_\_\_\_\_

RGH: \_\_\_\_\_ N° de Identificação no estudo: \_\_\_\_\_

Nome do responsável: \_\_\_\_\_

#### DADOS SOBRE O ESTUDO

Este é um projeto de pesquisa do Centro Internacional de Pesquisas e do Núcleo de Cirurgia Abdominal e Oncologia Clínica do AC Camargo Cancer Center, está sob responsabilidade do Dr. Emmanuel Dias-Neto.

Todos os estudos de pesquisa devem ser aprovados por um comitê de ética em pesquisa antes que qualquer sujeito possa participar. O comitê de ética ajuda a proteger os interesses dos sujeitos em estudos de pesquisa. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Tratamento e Pesquisa A. C. Camargo Cancer Center.

#### EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PARTICIPANTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

Convidamos você a participar deste estudo, que visa compreender as bases do desenvolvimento do câncer de estômago. Apesar de vários estudos já terem sido feitos, ainda faltam análises específicas que poderão ajudar a compreender por que o câncer se desenvolve, quão agressivo ele será e quais os pacientes que devem se beneficiar do tratamento quimioterápico antes da cirurgia e que tipo de tratamento seria mais adequado para cada paciente. Ainda não sabemos também sobre a importância ou influência da mistura de raças no comporta-

Rúbrica do participante  
de pesquisa ou  
responsável legal:

Rúbrica do pesquisador:

mento dos tumores, mas hoje dispomos de tecnologias modernas que permitem avaliar estas questões e contribuir para o melhor conhecimento desta doença.

### **Objetivos da pesquisa**

Este é um estudo sobre a importância de diversos fatores que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer gástrico. Neste estudo, usando amostras de pessoas saudáveis e de pessoas com câncer, avaliaremos as bactérias presentes no estômago, as alterações em substâncias importantes (como proteínas, e o material genético presente dentro das células, DNA e RNA), aspectos relacionados à etnia (“raça” - europeia, africana, asiática ou outras, que podem ter contribuído para a sua formação).

Em indivíduos saudáveis e naqueles com de câncer de estômago, iremos avaliar estas alterações e como elas variam entre indivíduos dos grupos com e sem doença. Iremos comparar ainda as alterações características de indivíduos que tenham uma ocorrência frequente de câncer na família, indivíduos com melhor ou pior resposta ao tratamento por quimioterapia e indivíduos com tumores de comportamento mais agressivo versus menos agressivo. Além disso, avaliaremos se as células dos tumores são mais sensíveis ao tratamento em comparação com as células normais do estômago. Análises destes dados podem ajudar na compreensão de um possível papel destes fatores no desenvolvimento do câncer e ainda no entendimento de que medicamentos seriam mais adequados a cada indivíduo.

### **Procedimentos que serão utilizados e propósitos**

Caso aceite, você poderá participar de todos os estudos, ou de apenas algum deles, dependendo do momento em que você tiver sido contatado e conforme você se enquadre nos grupos a serem avaliados. Para o projeto que estuda as bactérias presentes no estômago é necessário que você tenha um pedido de um exame de endoscopia (um exame onde uma sonda é passada por sua boca, até atingir o estômago, e permite a sua visualização), que deve ter sido solicitado pelo seu médico pessoal. Esclarecemos que o exame não é solicitado por um médico deste estudo e os seus custos não serão cobertos por este estudo. Neste exame o interior do seu estômago será analisado para ver se existem alterações. É feito um procedimento de lavagem do interior do estômago. Após a lavagem, o líquido é normalmente aspirado e jogado em lixo adequado. Se obtivermos a sua autorização, ao invés de descartarmos este líquido no lixo, ele será usado para os estudos. Para os demais estudos você pode participar na condição de um controle (sem diagnóstico de câncer) ou ainda caso o câncer de estômago tenha sido diagnosticado em você ou em membros da sua família. Neste caso, de acordo com o grupo do estudo em que você se enquadre, solicitamos sua autorização para a coleta de uma pequena amostra de saliva, de sangue (usando procedimentos de rotina). Para alguns estudos, pequenos fragmentos do tumor adicionais aos obtidos na rotina do seu tratamento ou de seus exames serão coletados. Em nenhum caso a coleta destas amostras irá prejudicar o seu diagnóstico nem o seu tratamento.

Rúbrica do participante  
de pesquisa ou  
responsável legal:

Rúbrica do pesquisador:

Caso aceite participar do estudo você deverá ter mais que 18 anos de idade.

Quando você receber este formulário, explicaremos a você quais as razões da pesquisa e seu objetivo. Possivelmente outros pesquisadores do AC Camargo devem te contatar para obter outras informações tais como alguns hábitos comuns tais como o que você geralmente come, bebe, se faz uso de cigarro ou bebidas com álcool, medicamentos e outros.

Esclarecemos ainda que você tem toda a liberdade de participar ou não do estudo, e sua decisão, seja ela qual for, não afetará de nenhum modo o seu tratamento. Caso você concorde, esta será uma colaboração voluntária, não havendo nenhuma forma de remuneração por isto. Do mesmo modo, esta decisão não afeta de nenhum modo o que será cobrado de você ou de sua seguradora de saúde durante o tratamento. A qualquer momento, mesmo que você já tenha concordado em participar e fornecido a sua assinatura, você tem toda a liberdade de desistir e solicitar o descarte da amostra coletada, sem que isso ocasione qualquer prejuízo a você ou a seu tratamento. Do mesmo modo, esta decisão não afeta de nenhum modo o que será cobrado de você ou de sua seguradora de saúde durante o tratamento. Além disso, você e seu acompanhante tem direito a ressarcimento caso venham a ter qualquer despesa relacionada a esta pesquisa.

Ressaltamos que você tem direito e receberá a assistência integral e imediata, de forma gratuita (pelo patrocinador do estudo), pelo tempo que for necessário em caso de danos decorrentes da pesquisa, mesmo diante de interrupção do estudo.

**Estudos a serem realizados e material necessário (marque nos quadros se você aceita participar, se não deseja participar, ou se o estudo não se aplica – caso o procedimento necessário não se aplique ao seu caso, conforme orientação que você terá recebido no momento de preenchimento deste documento)**

1) Avaliação das bactérias presentes no estômago e sua relação com o desenvolvimento do câncer de estômago. Amostra necessária: suco gástrico normalmente coletado durante a endoscopia, e que seria jogado fora. O que faremos: iremos determinar quais as bactérias podem ser encontradas em seu estômago e avaliaremos se elas podem ser associadas ao surgimento do câncer.  **aceito;**  **não aceito;**  **não se aplica.**

2) Avaliação de alternativas de diagnóstico usando compostos voláteis (elementos que evaporam) derivados da respiração ou que podem exalar a partir do suco gástrico. Amostra necessária: 1) suco gástrico normalmente coletado durante a endoscopia (como descrito acima), e 2) um pouco do ar que você exala quando respira. O que faremos: 1) serão avaliados os compostos que evaporam do suco gástrico, usando um aparelho específico; 2) pediremos para você soprar através de um canudo estéril e novo, para coletarmos e analisarmos compostos presentes na respiração. Os resultados talvez ajudem no desenvolvimento de testes simples e baratos para diagnosticar pacientes no futuro.  **aceito;**  **não aceito;**  **não se aplica.**

3) Avaliação de alterações de DNA relacionadas ao desenvolvimento do câncer (incluindo câncer familiar) ou aspectos de etnia (raça). Amostra necessária: uma pequena quantidade de saliva (cerca de 2mL) ou 15 mL de

Rúbrica do participante  
de pesquisa ou  
responsável legal:

Rúbrica do pesquisador:

sangue (equivalente a uma colher de sopa) de sangue coletado de uma veia do braço. O que faremos: no DNA obtido buscaremos alterações relacionadas com o desenvolvimento do câncer em função da raça (etnia) determinada por análise de DNA.  aceito;  não aceito;  não se aplica.

4) Avaliação de marcadores de resposta à quimioterapia. Amostra necessária: pequenos pedaços do tumor (coletados antes ou depois da quimioterapia) após diagnóstico; e 15 mL (equivalente a uma colher de sopa) de sangue coletado de uma veia do braço. As coletas de sangue poderão ser feitas em diferentes momentos do tratamento/acompanhamento médico. O que faremos: buscaremos alterações de substâncias (DNA, RNA ou proteínas) no material coletado, e no sangue buscaremos células tumorais.

aceito;  não aceito;  não se aplica.

5) Determinação de agressividade tumoral. Amostra necessária: pequenos pedaços do tumor, coletados normalmente no exame de endoscopia antes da quimioterapia, 15 mL (equivalente a uma colher de sopa) de sangue coletado de uma veia do braço. O que faremos: buscaremos alterações de substâncias (DNA, RNA ou proteínas) no material coletado.  aceito;  não aceito;  não se aplica.

6) **Determinação da sensibilidade do tumor a diferentes medicamentos.** Amostra necessária: pequenos pedaços do tumor e de tecido saudável, coletados normalmente no exame de endoscopia antes da quimioterapia ou durante sua cirurgia caso o senhor seja submetido a estes procedimentos como parte normal dentro do seu tratamento. O que faremos: **as células do tumor serão manipuladas em laboratório** e tratadas com os diferentes medicamentos disponíveis para o tratamento dos tumores gástricos, e sua sensibilidade a estes medicamentos (morte das células tumorais com menor efeito nas células normais) será avaliada. Estas células geram estruturas celulares microscópicas e tridimensionais, chamadas de organoides. Em alguns casos os organoides poderão ser usados para o teste de novas medicações ou para estudar a biologia e maior entendimento destes tumores. Em nenhum caso a coleta destas amostras irá prejudicar o seu diagnóstico nem o seu tratamento.

aceito;  não aceito;  não se aplica.

**Sobre o item 6 acima**, quando o projeto acabar, as suas células poderão ser descartadas ou, caso o sr (a) autorize, serem utilizadas em outros projetos futuros. As células tumorais podem ter longos períodos de existência, ou seja, podem ser mantidas por tempo indeterminado em condições laboratoriais específicas. Portanto, solicitamos autorização para armazenar o excedente das células tumorais propagadas no laboratório para utilizar projetos no futuro, após a devida aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). A partir de seu material biológico armazenado, pesquisas futuras poderão realizar novas abordagens científicas com o intuito de, por exemplo, investigar a ocorrência de outras alterações genéticas que possam ser importantes para o desenvolvimento do tumor. Em qualquer ocasião e a qualquer tempo, você terá o direito de acesso às informações e resultados obtidos com a utilização de seu material biológico armazenado, recebendo orientações

Rúbrica do participante  
de pesquisa ou  
responsável legal:

Rúbrica do pesquisador:

quanto as suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando necessário.

A utilização das suas células (organoides) está condicionada a aprovação de cada novo projeto pelo CEP desta Instituição, e quando necessário, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Dependendo da escolha do participante, poderá ser ou não necessária a assinatura de novo TCLE. Para isso, pedimos que o (a) senhor (a) escolha uma das seguintes opções quanto ao armazenamento de suas células:

Autorizo o armazenamento das minhas células ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros projetos após a aprovação do CEP.

Não autorizo o armazenamento das minhas células ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros projetos de pesquisa. Desta forma, compreendo que este material será descartado de acordo com as normas estabelecidas.

Caso você permita o uso das suas amostras em pesquisas futuras, favor assinalar uma das seguintes opções:

Quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa realizada no A.C. Camargo Cancer Center com meu material.

Não quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa no A.C. Camargo Cancer Center. Portanto, concordo que este TCLE, uma vez assinado, valerá também para os demais protocolos de pesquisa.

Em casos de óbito ou condições incapacitantes, o (a) senhor (a) tem a possibilidade de ceder os direitos sobre sua amostra biológica armazenada aos seus sucessores ou outras pessoas de sua confiança. Para isso, pedimos que expresse a sua vontade com base nas opções abaixo:

Cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas. Favor indicar ao menos 1 (um) nome de pessoa autorizada:

Nome: \_\_\_\_\_

Grau de Parentesco: \_\_\_\_\_

Telefone: ( ) \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

Não cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

**Observação:** caso você aceite participar de um ou mais estudos acima, que envolvam a coleta de sangue (estudos 3, 4, 5 e 6), esclarecemos que uma única coleta inicial já atende a todos estes estudos. No entanto, coletas em outros momentos que você vier ao A.C. Camargo podem ser necessárias para os estudos 4 e 5.

Rúbrica do participante  
de pesquisa ou  
responsável legal:

Rúbrica do pesquisador:

### **Complicações, riscos esperados e confidencialidade das informações**

Caso você participe doando uma pequena amostra de sangue, as raras complicações associadas a esta coleta compreendem: dor pela picada da agulha, pequeno sangramento ou hematoma (manchas roxas) no local onde foi usada a agulha para coletar o sangue, mas este não deve causar nenhum mal. Todas as perguntas que serão feitas a você, e também o método de coleta de células e amostras que serão utilizados neste estudo foram previamente empregados em outros estudos. Além disso, para este estudo, os pesquisadores precisarão ter acesso aos dados clínicos de seu prontuário. Todos os dados levantados serão usados apenas para esta pesquisa científica, visando a melhor compreensão do câncer de estômago. Todos os esforços serão feitos no sentido de manter a privacidade das informações, que ficarão restritas aos médicos, pesquisadores e enfermeiros diretamente envolvidos neste projeto. Neste sentido, todo e qualquer dado que possa levar à sua identificação será codificado, fazendo com que o risco de perda de confidencialidade seja mínimo.

### **Benefícios que poderão ser obtidos**

Os participantes não se beneficiarão diretamente com a participação nesse estudo. Contudo, o estudo contribuirá para um melhor entendimento dos fatores que podem causar o surgimento ou a evolução do câncer de estômago, desta forma ajudando no desenvolvimento de métodos de prevenção.

Caso concorde em participar, por favor, assine este Termo de Consentimento em 2 vias e rubriche todas as páginas. Uma ficará em seu poder e a outra será arquivada pelo pesquisador.

Em caso de dúvida, entre em contato com o Dr. Emmanuel Dias-Neto, no Laboratório de Genômica Médica do A.C. Camargo Cancer Center, pelo telefone (11) 2189-5023 ou pelo e-mail [emmanuel@accamargo.org.br](mailto:emmanuel@accamargo.org.br). Caso o pesquisador responsável não forneça informações/esclarecimentos suficientes, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente/A.C. Camargo Cancer Center pelo telefone (11) 2189-5020 ou pelo e-mail [cep@accamargo.org.br](mailto:cep@accamargo.org.br). Este Comitê de Ética se localiza à Rua Prof. Antônio Prudente, 211, Liberdade; horário de atendimento: segunda-feira à sexta-feira das 8 às 17 horas. O Comitê de Ética em Pesquisa é um grupo formado por cientistas e não-cientistas que realizam a revisão ética inicial e contínua do estudo clínico para manter sua segurança e proteger seus direitos.

### **CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO**

Declaro que, após ter sido adequadamente esclarecido dos riscos e benefícios deste estudo, conforme definidos acima, eu concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado: “Genômica de Adenocarcinomas Gástrico”.

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

---

Assinatura do participante ou responsável legal

---

Assinatura do pesquisador ou responsável pela aplicação do termo