

DIEGO BURGARDT

**ASSOCIAÇÃO DOS SUBGRUPOS MOLECULARES COM A RESPOSTA PATOLÓGICA NOS
PACIENTES COM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO SUBMETIDOS A QUIMIOTERAPIA
PERIOPERATÓRIA COM FLOT OU FOLFOX**

Projeto de Pesquisa apresentado ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Rui Manuel Reis
Coorientadores: Dr. Ricardo dos Reis
Me. Durval Wohnrath;

Área de Concentração: Oncologia

Barretos, SP
2021

FOLHA DE APROVAÇÃO

Diego Burgardt

Associação dos subgrupos moleculares com a resposta patológica nos pacientes com adenocarcinoma gástrico submetidos a quimioterapia perioperatória com FLOT ou FOLFOX

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação:

Banca Examinadora:

Nome Prof. Dr.
Instituição:

Nome Prof. Dr.
Instituição:

Nome Prof. Dr.
Instituição:

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DOS PESQUISADORES

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia	1
1.2	Fisiopatologia e tipos histológicos	2
1.3	Tratamento e prognóstico	3
1.3.1	Quimioterapia perioperatória e resposta patológica	4
1.4	Classificação molecular do adenocarcinoma gástrico	6
1.5	Biomarcadores preditivos de resposta à quimioterapia	8
1.6	EBV e adenocarcinoma gástrico	9
1.7	MSI no adenocarcinoma gástrico	10
1.8	E-caderina e adenocarcinoma gástrico	10
1.9	p53 no adenocarcinoma gástrico	11
2	JUSTIFICATIVA	12
3	OBJETIVOS	13
3.1	Geral	13
3.2	Específicos	13
4	MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1	Delineamento do estudo	14
4.2	Fator em estudo	14
4.3	Desfecho	14
4.4	População	14
4.5	Tamanho da amostra	14
4.6	Critérios de inclusão	14
4.7	Critérios de exclusão	15
4.8	Local do estudo	15
4.9	Condução do estudo e dados a serem coletados	15
4.9.1	Avaliação patológica	16
4.9.2	Análise do vírus Epstein-Barr (EBV)	17
4.9.3	Análise da Instabilidade de Microssatélite (MSI)	18
4.9.4	Análise da expressão proteica de E-caderina e p53 - Imunohistoquímica	19
4.9.5	Classificações dos subtipos moleculares de adenocarcinoma gástrico	20
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
6	ASPECTOS ÉTICOS	22

7	RESULTADOS	23
7.1	Características demográficas, clínicas e cirúrgicas	25
7.2	Descrição da resposta patológica conforme Becker e agrupada	28
7.3	Associação dos biomarcadores com as características clínicas e patológicas	33
7.4	Associação da resposta patológica agrupada com o perfil de EBV, MSI, E-caderina, p53, com a características clínicas e patológicas e os subtipos moleculares de adenocarcinoma gástrico	38
8	DISCUSSÃO	40
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
	ANEXO 1 - FICHA DE COLETA DE DADOS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Global Cancer Statistics 2020	1
Figura 2 - INCA, estimativa – incidência de câncer no Brasil. 2020	2
Figura 3 - Subgrupos moleculares de acordo com o TCGA	6
Figura 4 – Classificação molecular de adenocarcinoma gástrico baseado em Setia et al	7
Figura 5 - Classificação molecular substituta do TCGA, segundo Gonzales et al	8
Figura 6 – Classificação histológica e molecular de adenocarcinoma gástrico	8
Figura 7 - Fluxograma do estudo	20
Figura 8 - Descrição das exclusões	24
Figura 9 - Classificação de Becker	29
Figura 10 - Hibridização in situ com EBER	30
Figura 11 - PCR para MSI	31
Figura 12 - Imunohistoquímica da E-caderina	32
Figura 13 - Imunohistoquímica de p53	33
Figura 14 - Resultado dos subtipos moleculares substituto do TCGA segundo Gonzales et al	36
Figura 15 - Resultado dos subtipos moleculares segundo setia et al	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de resposta patológica conforme Becker et al	6
Tabela 2 - Características demográficas, clínico-patológicas e cirúrgicas	26
Tabela 3 - Descrição da resposta patológica	28
Tabela 4 - Descrição do status de EBV, MSI, E-caderina e p53	30
Tabela 5 – Associação do perfil de EBV, MSI, E-caderina e p53 com as características clínicas e patológicas.	35
Tabela 6 - Associação da resposta patológica agrupada com o perfil de EBV (vírus Epstein-Barr), MSI (instabilidade de microssatélite), E-caderina e p53, com as características clínicas e patológicas e os subtipos moleculares de adenocarcinoma gástrico.	38

RESUMO

Introdução: o adenocarcinoma gástrico é um problema de saúde pública com sobrevida aproximada de 25% em 5 anos. Com o intuito de melhorar a sobrevida nestes pacientes, a quimioterapia é utilizada isolada ou em combinação com a radioterapia como tratamento padrão associado à cirurgia. Desde 1989, utiliza-se a quimioterapia perioperatória, visando a redução tumoral e o tratamento das micrometástases. Apesar desta abordagem, apenas cerca de metade dos pacientes conseguem terminar a fase pós-operatória da quimioterapia e, além disso, alguns pacientes não respondem ao tratamento quimioterápico, apresentando apenas toxicidade ao tratamento e atraso da cirurgia. Desta forma, se faz necessário a descoberta de biomarcadores que consigam individualizar o tratamento ideal para cada paciente. De acordo com o Atlas Genoma de Câncer (TCGA) gástrico, o adenocarcinoma foi dividido em quatro subtipos moleculares: Epstein-Barr vírus (EBV), instabilidade de microssatélite (MSI) instabilidade cromossomal (CIN), e estabilidade genômica (GS), que estão associados a diferentes prognósticos. Devido à complexidade e custo de metodologias utilizados pelo TCGA, outros painéis emergiram tentando implementar os subgrupos de forma prática e com custos menores, utilizando a pesquisa de MSI, EBV, e imunohistoquímica de p53 e E-caderina.

Objetivo: Avaliar a associação de subgrupos moleculares com a resposta patológica em pacientes com adenocarcinoma gástrico submetidos a quimioterapia perioperatória com FLOT ou FOLFOX.

Material e Métodos: Foram avaliados 90 pacientes com adenocarcinoma gástrico submetidos a tratamento perioperatório com FLOT-4 ou FOLFOX-6 e posterior cirurgia no período de janeiro de 2017 a dezembro de 2019 do Hospital de Amor de Barretos. Utilizando os critérios de Becker, foi graduada a resposta patológica à quimioterapia. Nas biópsias pré-quimioterapia foi analisado o perfil molecular de MSI, análise de *hibridização in situ* de EBV, e imunohistoquímica das proteínas E-caderina e p53. Os dados clinicopatológicos e subgrupos moleculares dos pacientes foram associados entre si e com a resposta patológica.

Resultados: A resposta patológica completa foi observada em 10% dos pacientes analisados, e 23% foram classificados como bom respondedores à quimioterapia. Encontramos uma associação estatística entre bom respondedores com o grupo p53 aberrante forte positivo e com os subtipos histológico intestinal de Laurén e tubular da OMS nas biópsias endoscópicas. O perfil de MSI-H foi encontrado em 10% dos pacientes e, associado a idade avançada. A

presença de EBV foi observada em 11,1% dos casos e, associada com tumores maiores e com número aumentado de linfonodos metastáticos. A expressão aberrante de E-caderina e p53 foi encontrada respectivamente em 14,4% e 26,7% dos pacientes.

Conclusão: Não encontramos associação dos subtipos moleculares de adenocarcinoma gástrico com a resposta patológica a quimioterapia perioperatória. A expressão da proteína p53 forte positiva foi associada a boa resposta patológica a quimioterapia.

Palavras-chaves: adenocarcinoma gástrico, quimioterapia perioperatória, resposta patológica, subgrupos moleculares, instabilidade de microssatélite, vírus Epstein-Barr, p53 e E-caderina.

ABSTRACT

Introduction: Gastric adenocarcinoma is a public health problem with an approximate survival rate of 25% in 5 years. In order to improve survival in these patients, chemotherapy is used alone or in combination with radiotherapy as standard treatment associated with surgery. Since 1989, perioperative chemotherapy has been used, aiming at tumor reduction and treatment of micrometastasis. Despite this approach, only about half of the patients manage to complete the adjuvant phase of chemotherapy and, in addition, some patients do not respond to chemotherapy treatment, presenting only toxicity to the treatment and delay in surgery. Thus, it is necessary to discover biomarkers that can individualize the ideal treatment for each patient. According to The Genome Atlas of Cancer (TCGA) of gastric cancer, adenocarcinoma has been divided into four molecular subtypes: Epstein-Barr virus (EBV), microsatellite instability (MSI), chromosomal instability (CIN), and genomic stability (GS), which are associated with a different prognosis in gastric cancer patients. Due to the complexity and cost of methodologies used by the TCGA, other panels have emerged trying to implement the molecular subgroups in a practical way and with lower costs, using the research of MSI, EBV, and p53 and E-cadherin immunohistochemistry.

Aim: To evaluate the association of molecular subgroups with the pathological response in patients with gastric adenocarcinoma undergoing perioperative chemotherapy with FLOT or FOLFOX chemotherapy schemes.

Material and Methods: 90 patients with gastric adenocarcinoma who underwent perioperative treatment with FLOT-4 or FOLFOX-6 and subsequent surgery from January 2017 to December 2019 at Hospital de Amor de Barretos were evaluated. Using Becker's criteria, the pathological response to chemotherapy was graded. Pre-chemotherapy biopsies analyzed the molecular profile of MSI, in situ hybridization analysis of EBV, and immunohistochemistry of E-cadherin and p53 proteins. The clinicopathological data and molecular subgroups of the patients were associated with each other and with the pathological response.

Results: A complete pathological response was observed in 10% of patients analyzed, and 23% were classified as good responders to chemotherapy. We found a statistical association between good responders with the positive strong aberrant p53 group and with the intestinal Laurén and WHO tubular histological subtype in endoscopic biopsies. The MSI-H profile was

found in 10% of patients, being associated with advanced age. The presence of EBV was observed in 11.1% of cases and was associated with larger tumors and an increased number of metastatic lymph nodes. Aberrant expression of E-cadherin and p53 was found in respectively 14.4% and 26.7% of patients.

Conclusion: The pathological response of gastric adenocarcinoma to perioperative chemotherapy was not associated of molecular subtypes. Strong positive p53 protein expression was associated with good pathological response to chemotherapy.

Keywords: gastric adenocarcinoma, perioperative chemotherapy, pathological response, molecular subgroups, microsatellite instability, Epstein-Barr virus, p53 and E-cadherin.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

As neoplasias malignas gástricas representam um importante problema de saúde. No mundo, em 2020 (figura 1), foram a sexta com maior incidência, com 1 milhão e 89 mil novos casos (5,6% do total), sendo a quarta mais incidente entre os homens e a sétima entre as mulheres. Ainda em 2020, foram responsáveis por 768 mil mortes (7,7% das mortes causadas por câncer), sendo o terceiro câncer mais letal¹. Mundialmente, o câncer gástrico é mais frequente em países com índice de desenvolvimento baixo ou médio, sendo que as taxas mais elevadas, que alcançam 35,4/100mil para os homens encontram-se na Ásia Oriental².

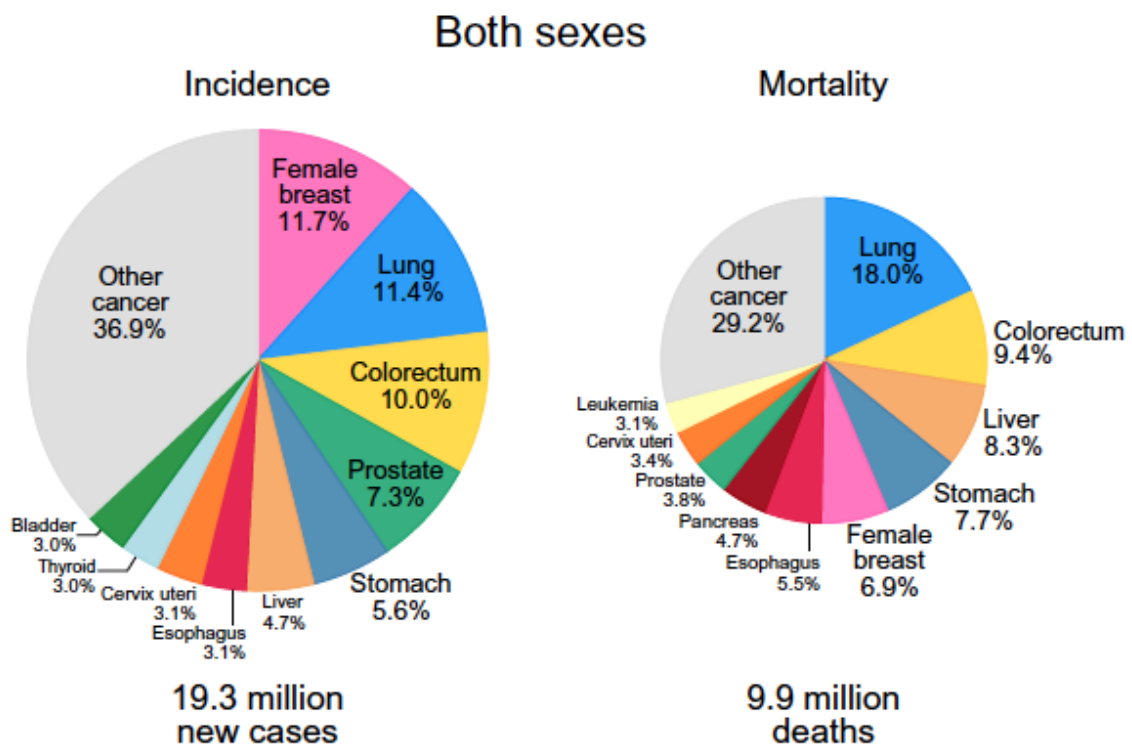


Figura 1 - Global Cancer Statistics 2020

No Brasil, os dados publicados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) referentes a 2020 (figura 2), que contemplam o triênio 2020-2022, estimam que o câncer gástrico é responsável por 13.360 novos casos entre os homens por ano e 7.870 entre as mulheres. Ele é considerado o 4º tumor mais incidente no sexo masculino e o 6º no sexo feminino.

Apresenta variações de incidência entre as regiões, sendo entre os homens o segundo mais frequente na região norte².

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 2 - INCA, estimativa – incidência de câncer no Brasil. 2020

1.2 Fisiopatologia e tipos histológicos

Entre as neoplasias malignas de estômago, o adenocarcinoma é o tipo histológico mais comum, corresponde a mais de 90% dos casos. De acordo com a classificação de Laurén³, de 1965, são divididos em 2 tipos histológicos: intestinal e difuso.

Em 2019, a Organização Mundial da Saúde (WHO), dividiu os adenocarcinomas gástricos nos seguintes subtipos: adenocarcinoma tubular (o de maior prevalência, podendo ser bem, moderado e mal diferenciado, sendo mais comum em pacientes idosos); adenocarcinoma papilar (relativamente raro, normalmente bem diferenciado, apesar disso associado com metástases hepáticas e baixa sobrevida); carcinoma pouco coeso (incluindo o subtipo com células em anel de sinete e o com outros tipos de células, sendo o segundo subtipo mais comum); adenocarcinoma mucinoso (caracterizado pela presença de mucina em mais de 50% do tumor); adenocarcinoma misto (caracterizado pela presença de células glandulares e anel de sinete) e outros tipos mais raros como o carcinoma com estroma linfóide, carcinoma adenoescamoso, carcinoma com células escamosas, adenocarcinoma hepatóide e o adenocarcinoma micropapilar⁴.

A infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (Hp) é importante agente etiológico de câncer gástrico, tanto para os linfomas tipo MALT quanto para os adenocarcinomas do tipo

intestinal. Entre os demais fatores ambientais, pode-se citar a dieta rica em sal, alimentos defumados, obesidade, uso excessivo de álcool e tabagismo⁵.

Os fatores hereditários respondem por menos de 2% dos casos, sendo que o principal é o câncer gástrico difuso hereditário, no qual ocorre uma mutação no gene *CDH1*, que codifica uma proteína de adesão celular chamada E-caderina. Com a mutação deste gene, há a diminuição da expressão desta molécula de adesão ocasionando a dispersão das células no parênquima e conseqüentemente relacionando-se ao adenocarcinoma com células não coesas, também chamado tipo difuso de Laurén^{5, 6}.

1.3 Tratamento e prognóstico

Sabe-se que a cirurgia (gastrectomia com linfadenectomia D2) é o tratamento padrão para o adenocarcinoma gástrico avançado e 30 a 50% dos pacientes são tratados com intenção curativa^{7, 8}. A ressecção cirúrgica com adequada linfadenectomia permanece como a melhor chance de cura⁹, mesmo assim observa-se uma sobrevida entre 20 a 30% em 5 anos⁸. No Hospital de Amor de Barretos, nova designação do Hospital de Câncer de Barretos, pacientes com adenocarcinoma gástrico submetidos a gastrectomia com linfadenectomia D2 associados ou não a radioterapia e quimioterapia adjuvantes, apresentaram uma sobrevida global em 5 anos de 43,2%¹⁰. Por outro lado, esta mesma sobrevida por câncer gástrico chega a 70% no Japão e em outros países orientais onde a alta incidência da doença é compensada com programas de rastreamento endoscópico que visam detectar e tratar os tumores em estágios precoces^{7, 11}.

Um dos principais fatores prognósticos de pacientes operados por câncer gástrico é o número de linfonodos metastáticos e a relação entre os linfonodos metastáticos e o total de linfonodos removidos⁷. No Hospital de Câncer de Barretos, a razão entre linfonodos positivos e removidos, quando $\geq 11\%$, foi um fator independente negativo de prognóstico em pacientes com adenocarcinoma gástrico submetidos a gastrectomia com intenção curativa¹². Entre os pacientes tratados com intenção curativa na China, 40 a 60% deles tiveram recidiva e esta usualmente ocorreu em 2 anos¹³. Sabe-se que existem três formas de recorrência: local, metástase a distância e carcinomatose peritoneal. Um estudo chinês de padrões de recidiva com 1304 pacientes com adenocarcinoma gástrico operados, reportou que os locais de metástases a distância mais acometidos em ordem de frequência foram: linfonodos a distância, fígado, pulmão, ossos e pleura¹³. Os autores relataram também que o risco de

recorrência foi maior em pacientes com adenocarcinoma gástrico do tipo difuso de Laurén (risco relativo (RR) de 1,8) e nos pacientes operados em hospital geral e não oncológico (RR de 1,6)¹³.

Atualmente, encontra-se em evidência o uso de imunoterapia para tratamento de neoplasias. Em relação, ao adenocarcinoma gástrico e de transição esôfago-gástrica (TEG) a utilização de imunoterapia (pembrolizumab) associado ou não a quimioterapia mostrou ganho de sobrevida global nos pacientes com instabilidade de microssatélite (MSI)¹⁴. Ainda em um estudo asiático com 724 pacientes de adenocarcinoma gástrico e de TEG avançados, a associação de imunoterapia (nivolumab) mais quimioterapia ou placebo mais quimioterapia atingiu uma maior sobrevida livre de progressão para o grupo de imunoterapia¹⁵. Outro estudo europeu, com 1581 pacientes com adenocarcinoma avançado de estômago, de TEG e de esôfago, demonstrou ganho de sobrevida global e sobrevida livre de progressão no grupo submetido ao tratamento com imunoterapia (nivolumab) mais quimioterapia versus quimioterapia apenas¹⁶.

1.3.1 Quimioterapia perioperatória e resposta patológica

Com o intuito de se obter melhores índices de sobrevida, tem-se utilizado a associação de quimioterapia e radioterapia para o tratamento de câncer gástrico avançado⁹. Inicialmente, foi utilizado no cenário adjuvante, sendo que o principal estudo é o Intergroup-0116, que utilizou 5-Fluorouracil e Leucovorin associado a radioterapia na dose de 4500 cGy¹⁷.

A partir de 1989, tem-se empregado para os tumores avançados a quimioterapia como tratamento neoadjuvante¹⁸. O racional do seu uso é a capacidade de redução do tamanho do tumor, aumentando as taxas de ressecção R0 (margens livres), eliminação das micrometástases, além de determinar a sensibilidade tumoral à quimioterapia^{8, 19}.

Evidências recentes demonstraram o ganho de sobrevida global e livre de doença em pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico na forma perioperatória¹⁹⁻²¹. Esta modalidade de tratamento é o novo padrão no ocidente para pacientes com tumor estadiado por método de imagem como cT2 ou superior, e/ou com linfonodos perigástricos clinicamente positivos (cN+). Entre estes trabalhos que utilizaram quimioterapia perioperatória, os dois mais importantes foram o MAGIC¹⁹ que utilizou a epirrubicina, a cisplatina e o 5-fluorouracil e o FLOT²⁰ que utilizou docetaxel, oxalapatina, 5-fluorouracil e leucovorina. As taxas de resposta patológica completa após a fase pré-operatória da quimioterapia foram respectivamente de

6% e 16% ($p=0,02$), mostrando a melhor eficácia do regime FLOT²⁰. Além disso, as taxas de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD) foram maiores no regime FLOT quando comparadas ao MAGIC, 50 meses versus 35 meses de SG ($p=0,012$) e 30 meses versus 18 meses para SLD ($p=0,004$) respectivamente²².

Outra combinação de quimioterápicos utilizada na prática clínica é o regime FOLFOX, composto por 5-fluorouracil, leucovorina e oxalapatina. Inicialmente, foi utilizada para adenocarcinoma gástrico no cenário paliativo e mais tarde como perioperatória. Um trabalho Chinês que comparou o uso deste regime no cenário perioperatório versus adjuvante encontrou sobrevida global de 4 anos em 78% e 51% dos pacientes respectivamente, além de uma taxa de resposta patológica completa de 6% no grupo perioperatório²³.

A resposta patológica completa é um importante fator prognóstico que pode estar relacionado com a cura. Uma recente metanálise, que englobou 17 estudos relacionando resposta patológica e sobrevida, mostrou que resposta patológica completa ou quase completa (mais de 90% de resposta) reduziu em mais de 50% o risco de morte, independente do escore utilizado²⁴. Uma crítica às escalas de resposta patológica é que estas são observador dependente, o que dificulta uma padronização entre diferentes patologistas para a reprodução do método²⁵. Existem várias escalas utilizadas para avaliar o grau de resposta patológica após a quimioterapia pré-operatória, entre elas estão a classificação de Mandard et al. (avalia o grau de fibrose em relação a células tumorais residuais) e Becker et al. (avalia a porcentagem de células tumorais residuais tratadas)²⁶.

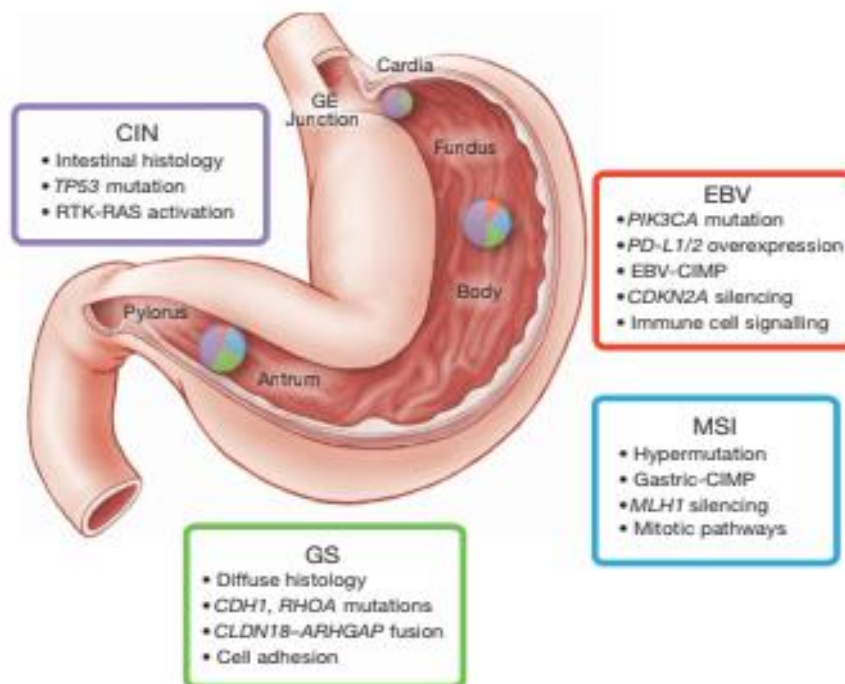
Becker et al.²⁷, avaliaram a resposta patológica de 480 peças cirúrgicas de pacientes com adenocarcinoma gástrico submetidos à quimioterapia neoadjuvante baseada em platina²⁷. Os autores observaram que 21,2% dos pacientes tiveram resposta patológica completa (grau 1a) ou quase completa (grau 1b - menos de 10% de tumor residual), 25,2% tiveram resposta parcial (grau 2 - 10-50% de tumor residual) e 53,5% tiveram resposta mínima (grau 3 - mais que 50% de tumor residual) ou ausência de resposta (Tabela 1). O trabalho demonstrou que o grau de regressão tumoral se correlacionou com a sobrevida, sendo que pacientes com resposta grau 1a e 1b tiveram uma sobrevida média de 128 meses, grau 2 de 61,9 meses e grau 3 de 65,8 meses. Assim, concluíram que resposta patológica teve alto valor prognóstico para pacientes com adenocarcinoma gástrico²⁷.

Tabela 1 - Classificação de resposta patológica conforme Becker et al²⁷

Grau de Becker	Significado	Agrupamento
1a	Resposta patológica completa	Bom respondedor
1b	Resposta patológica quase completa (10% de células tumorais residuais)	
2	Resposta patológica parcial (10 - 50% de células tumorais residuais)	Mau respondedor
3	Resposta patológica mínima ou ausência de resposta	

1.4 Classificação molecular do adenocarcinoma gástrico

O primeiro e grande estudo que avaliou de forma biologicamente aprofundada integrada o câncer gástrico foi o The Cancer Genoma Atlas (TCGA)(figura 3), que avaliou molecularmente 295 tumores gástricos²⁸. Baseado neste estudo, 4 subtipos moleculares foram sugeridos: I) tumor positivo para *Epstein-Barr* vírus (EBV) em 9% dos casos, no qual ocorre uma extrema hipermetilação do DNA; II) genomicamente estáveis (GS) em 20%, nos quais a maior parte é do subtipo difuso de Laurén; III) tumores com instabilidade cromossômica (CIN) em 50% dos casos, marcados por aneuploidia e amplificação focal de receptor de tirosina quinase; IV) e com instabilidade de microsatélite (MSI) encontrado em 22%, caracterizados por elevadas taxas de carga mutacional²⁸.

**Figura 3** - Subgrupos moleculares de acordo com o TCGA

A importância na separação destes 4 subtipos moleculares é a definição do tratamento ideal, bem como o desenvolvimento de terapias alvo para cada tipo específico, como já ocorre nas neoplasias de mama^{28, 29}.

Entre os quatro subtipos moleculares de adenocarcinoma gástrico do TCGA, o subtipo EBV apresentou melhor SG e SLD, seguido dos subtipos MSI e CIN e GS³⁰. A maioria dos pacientes com EBV foram do gênero masculino, pacientes com MSI foram mais idosos e a maior parte do gênero feminino. Não houve diferença estatística de prevalência quanto aos subtipos moleculares nos pacientes do ocidente versus aos do oriente²⁸.

Com o intuito de facilitar e tornar mais acessível uma rotina laboratorial a classificação molecular de adenocarcinoma gástrico após o TCGA, outros métodos têm sido desenvolvidos. Uma classificação, realizada em Rochester por Setia et al³¹ (figura 4), baseado na expressão proteica e de RNA mensageiro, utilizou técnicas ideais para material de arquivo parafinado, como a hibridização *in situ* e a imunohistoquímica. Os autores dividiram o adenocarcinoma gástrico em 5 subtipos moleculares: EBV, MSI, E-caderina aberrante e p-53 aberrante ou normal. Os autores, encontraram melhor sobrevida nos grupos EBV e MSI, porém sem diferença estatística.

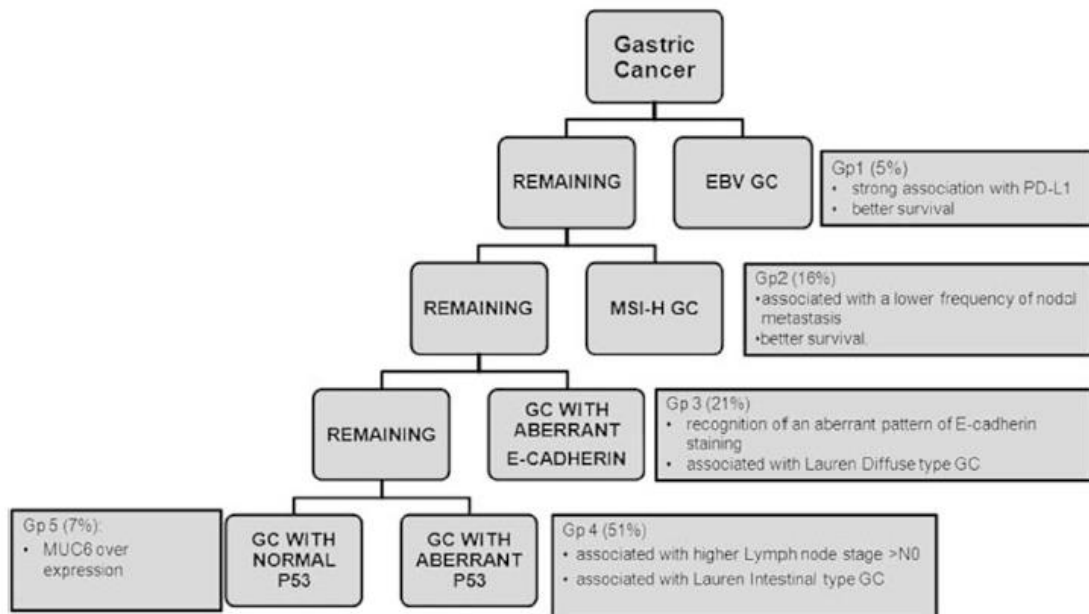


Figura 4 – Classificação molecular de adenocarcinoma gástrico baseado em Setia et al³¹

Mais tarde em 2016, uma classificação molecular de adenocarcinoma gástrico foi proposta por Gonzales et al³² e também utilizou metodologias de rotina como a hibridização *in situ* para EBV e imunohistoquímica para a definição de MSI e p53. Desta forma, definiram 4 subtipos moleculares (figura 5) e correlacionados com os tipos do TCGA, visando a reprodutibilidade do método. O tipo EBV apresentou a melhor sobrevida, porém estatisticamente não significativo.

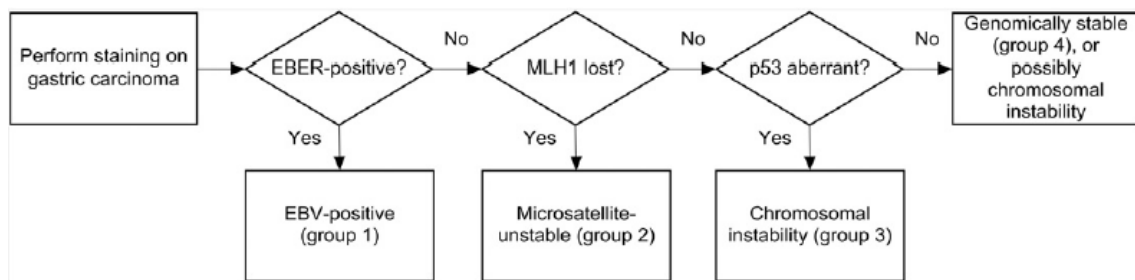


Figura 5 - Classificação molecular substituta do TCGA, segundo Gonzales et al³²

Assim, considera-se o adenocarcinoma gástrico uma doença complexa multifatorial com diferentes etiologias. Buscando a melhor compreensão, há diversas classificações histológicas e moleculares, com similaridades entre si conforme Seeneevassen et al³³ (figura 6).

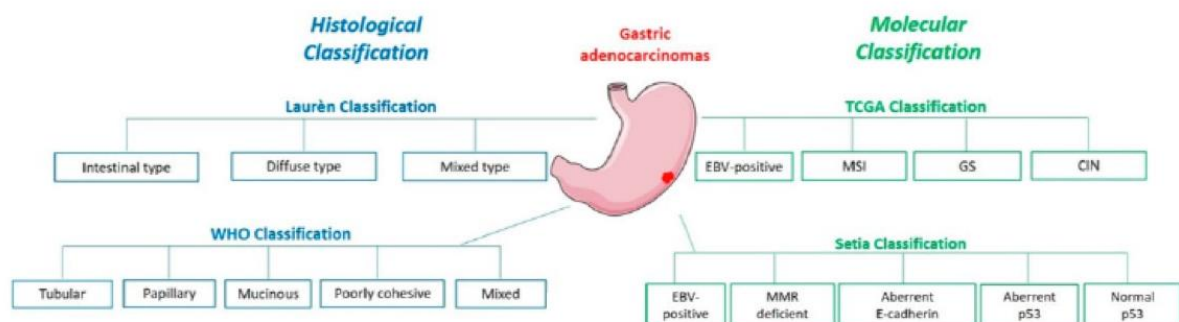


Figura 6 – Classificação histológica e molecular de adenocarcinoma gástrico³³

1.5 Biomarcadores preditivos de resposta à quimioterapia

Para uma melhor decisão terapêutica, é fundamental identificar biomarcadores visando selecionar cada paciente para um tratamento ideal, mesmo porque menos da metade

dos pacientes que realizam por completo a quimioterapia pré-operatória consegue terminar a fase pós-operatória. Nestes pacientes, uma estratégia a ser utilizada é realizar o tratamento completo quimioterápico antes da cirurgia³⁴. Infelizmente, para o câncer gástrico ainda não existem estes marcadores moleculares, utilizados na prática clínica, como preditivos de resposta à quimioterapia neoadjuvante ou perioeratória³⁵.

Para adenocarcinoma gástrico no cenário paliativo, quer seja localmente avançado irrisecável ou metastático, o marcador mais utilizado é o HER2 (receptor 2 do fator de crescimento humano, uma proteína tirosina-quinase) que quando os pacientes apresentam alta expressão apresentaram ganho de sobrevida global no tratamento da associação do anticorpo anti-Her2 (Trastuzumab) mais quimioterapia versus quimioterapia sozinha conforme demonstrado no TOGA trial³⁶.

1.6 EBV e adenocarcinoma gástrico

A presença de EBV se mostrou como um subgrupo importante no câncer gástrico. O EBV, também conhecido como herpes vírus tipo 4, é um dos herpes vírus mais comuns, infectando mais de 90% das pessoas através da forma lítica ou latente³⁷. Ele foi o primeiro vírus associado a neoplasias malignas humanas, descoberto em 1964, em células de linfoma de Burkitt³⁸. Mais tarde, foi descoberta a associação com outras neoplasias malignas como o carcinoma de nasofaringe, o linfoma de Hodgkin, o linfoma NK (*natural Killer*) de células T e o adenocarcinoma gástrico associado ao EBV (EBVaGC)³⁹.

A carcinogênese relacionada ao EBVaGC ainda não é completamente compreendida. Acredita-se que a origem do EBVaGC seja por via direta em 9% dos casos nos quais o vírus em infecção latente nas células expressa oncogenes ou por via indireta, presente na maioria dos casos, em que a agressão tecidual pelo vírus favorece a inflamação gástrica crônica causando consequente aumento da reativação viral local⁴⁰. O EBVaGC é mais comum entre os homens e mais frequente nas partes proximais do estômago e apresenta um prognóstico favorável^{37, 40}. Os fatores associados a este subtipo de câncer gástrico são: consumo excessivo de alimentos salgados ou apimentados, café e bebidas em alta temperatura, exposição a limalhas de madeira, ferro e tabagismo³⁷. Existe uma alta resposta imune na maioria dos pacientes com EBVaGC e esta resposta alguns autores têm relacionado com o melhor prognóstico³⁷.

Os trabalhos de adenocarcinoma gástrico com EBV positivo, mostraram uma prevalência de 7%⁴¹ a 10%⁴², com ausência de benefício da quimioterapia na sobrevida global neste subgrupo de pacientes^{41, 42}.

1.7 MSI no adenocarcinoma gástrico

Está bem estabelecido que a presença de alta instabilidade de microssatélites (MSI-H), ou seja MSI positivo, está associado a um bom prognóstico para pacientes com neoplasias de cólon, inclusive com mudança de tratamento uma vez que os pacientes operados no estágio II não fazem tratamento adjuvante quando apresentam MSI-H⁴³.

Sobre a relação de MSI com adenocarcinoma gástrico, Smyth et al⁴⁴, avaliaram a população do estudo MAGIC, encontraram MSI-H em 20 pacientes (6,6%). Nestes pacientes, a localização do tumor foi somente no estômago e nenhum foi localizado no esôfago distal ou TEG, foi mais comum em mulheres idosas, porém sem diferença estatística. Nenhum paciente tratado com quimioterapia neoadjuvante do grupo MSI-H teve boa resposta patológica. Por outro lado, no grupo sem MSI (MSS) ou baixa instabilidade (MSI-L), que constituem o grupo de MSI negativo, ocorreu uma resposta patológica satisfatória em 16% dos casos. O grupo com MSI-H tratado com cirurgia de princípio não atingiu a mediana de sobrevida global versus 20,3 meses no grupo com MSS/MSI-L. Por fim, o grupo tratado com quimioterapia neoadjuvante e cirurgia com MSI-H teve uma sobrevida global mediana de 9,6 meses versus 20,3 meses neste mesmo grupo com MSS/MSI-L⁴⁴.

A prevalência de MSI-H nos pacientes com adenocarcinoma gástrico varia de 6,7%⁴¹ a 18,5%⁴², sendo associada a um melhor prognóstico e perda de benefício com a quimioterapia^{45, 46}. Deste modo, para adenocarcinoma gástrico a MSI-H foi um favorável marcador prognóstico quando ele é ressecável e pode indicar um grupo de pacientes com benefício a imunoterapia⁴⁷.

1.8 E-caderina e adenocarcinoma gástrico

A E-caderina é uma molécula de adesão celular glicoproteica da membrana mediada por cálcio, codificada pelo gene supressor tumoral *CDH1*, localizado no cromossomo 16^{48, 49}. Apresenta função essencial para o estabelecimento da arquitetura epitelial e manutenção da polaridade e diferenciação celular⁵⁰.

As alterações genéticas e epigenéticas da E-caderina possuem um papel primordial nos distúrbios de adesão e estrutura celular. Desta forma, a perda funcional da E-caderina precede a progressão tumoral e a invasão tumoral de tecidos adjacentes e as metástases nos adenocarcinomas gástricos⁵⁰.

Uma metanálise⁵¹ com 4.385 pacientes com câncer gástrico encontrou associação da baixa/ausente expressão de E-caderina com o subtipo difuso de Laurén, tumores mais profundos, mais linfonodos comprometidos e metástases, tumores indiferenciados e pior sobrevida global.

1.9 p53 no adenocarcinoma gástrico

O gene *TP53*, localiza-se no cromossomo 17⁵², sendo responsável pela codificação da proteína p53. Ele é considerado o "guardião do genoma" por seu papel fundamental no reparo do DNA e apoptose nos casos necessários⁵³. Assim, mutações no gene *TP53* são responsáveis por grande parte das neoplasias, inclusive as gástricas⁵².

Pacientes com adenocarcinoma gástrico e p53 aberrante foram mais do sexo masculino, com tumores do tipo intestinal de Laurén, com maior invasão na profundidade e número de linfonodos comprometidos⁵⁴. Ainda, estes pacientes tiveram uma melhor resposta a quimioterapia neoadjuvante numa metanálise com 564 pacientes⁵⁵.

2 JUSTIFICATIVA

O conhecimento dos subgrupos moleculares de câncer gástrico no Brasil é escasso, e ausente em pacientes com adenocarcinoma gástrico submetidos a quimioterapia perioperatória.

Diferentemente do que ocorre com os tumores da mama e do cólon, cujos marcadores atualmente sinalizam os melhores esquemas terapêuticos, há necessidade de identificar estes biomarcadores preditivos de resposta ao tratamento em tumores gástricos de pacientes submetidos à quimioterapia perioperatória com FLOT-4 ou FOLFOX-6, principalmente identificando estes marcadores em biópsias endoscópicas pré-quimioterapia, para futura avaliação do seu papel preditivo de resposta.

Portanto, um estudo translacional em pacientes que realizam quimioterapia perioperatória, com o objetivo de avaliar a resposta patológica e associar com os subtipos moleculares de adenocarcinoma gástrico, se faz necessário para um melhor entendimento deste grupo de pacientes, buscando uma individualização do melhor tratamento.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Determinar os subtipos moleculares de adenocarcinoma gástrico nos pacientes submetidos a quimioterapia perioperatória com FLOT-4 ou FOLFOX-6 e sua associação com a resposta patológica.

3.2 Específicos

1. Determinar a resposta patológica de acordo com os critérios de Becker²⁷;
2. Avaliar as características clínicas, cirúrgicas e de anatomia patológica dos pacientes;
3. Avaliar a presença de MSI e EBV, além da expressão de E-caderina e p53 nas biópsias endoscópicas pré-quimioterapia e sua associação com a características clínicas e patológicas;
4. Definir os subtipos moleculares de adenocarcinoma gástrico nas biópsias endoscópicas pré-quimioterapia;
5. Associar as características clínicas, patológicas e moleculares com a resposta patológica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Estudo transversal retrospectivo/observacional.

4.2 Fator em estudo

Pacientes com adenocarcinoma gástrico estadiados clinicamente pela tomografia computadorizada e videolaparoscopia estadiadora como cT2 ou mais e/ou com linfonodos positivos (cN+) que foram submetidos a quimioterapia perioperatória com FLOT-4 ou FOLFOX-6.

Estadiamento utilizado – TNM Classification of Malignant tumors, 8th Ed, UICC,2017⁵⁶.

4.3 Desfecho

Resposta patológica na peça final cirúrgica, avaliada por um mesmo patologista, através dos critérios de Becker.

4.4 População

Pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico submetidos a quimioterapia perioperatória com FOLFOX-6 ou FLOT-4 e operados, tratados no Hospital de Amor (antigo Hospital de Câncer de Barretos), em Barretos, no período de janeiro de 2017 a dezembro de 2019.

4.5 Tamanho da amostra

Para o cálculo de associação do subtipo molecular com a resposta patológica em pacientes com adenocarcinoma gástrico submetidos a quimioterapia perioperatória, foram incluídos todos os pacientes com as características acima descritas. A amostra foi não probabilística por conveniência.

4.6 Critérios de inclusão

- Pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico que foram submetidos a quimioterapia perioperatória (esquema FOLFOX-6 ou FLOT-4) e operados durante o período

do estudo (janeiro de 2017 a dezembro de 2019) que tinham biópsia endoscópica prévia a quimioterapia para avaliação do subtipo molecular.

4.7 Critérios de exclusão

- Pacientes que apresentaram toxicidade às drogas quimioterápicas obrigando a suspensão precoce do esquema ou que tenham realizado menos de 50% dos ciclos propostos da quimioterapia pré-operatória.
- Pacientes com tumores da transição esofagogástrica (TEG) que necessitaram de esofagectomia como cirurgia.
- Pacientes com estágio clínico IV.
- Pacientes com histologia tumoral diferente do adenocarcinoma.
- Pacientes que tiveram segundo tumor primário sincrônico ou metacrônico.
- Pacientes cujo material proveniente da biópsia endoscópica foi insuficiente para realização das avaliações moleculares.

4.8 Local do estudo

O estudo foi realizado através da coleta de dados de pacientes registrados na Fundação Pio XII – Hospital de Amor, em Barretos. A análise de resposta patológica foi realizada no Departamento de Patologia, e a realização do perfil molecular foi realizado no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos.

4.9 Condução do estudo e dados a serem coletados

Os dados foram catalogados em ficha padronizada para avaliar as características demográficas, clínicas, cirúrgicas e de anatomopatológico (Anexo 1). Para determinação do subtipo molecular: perfil de MSI (MSI-H versus MSS ou MSI-L), EBV (positivo versus negativo), E-caderina (normal versus aberrante) e p53 (normal versus aberrante (nulo ou forte positivo)), foi realizada a análise nos blocos de parafina das biópsias endoscópicas pré-quimioterapia de cada paciente. Estes dados foram armazenados no sistema REDCap⁵⁷.

Todos os pacientes incluídos no estudo tiveram revistos seus diagnósticos histopatológicos por um mesmo patologista especializado em neoplasias gástricas com o intuito de se confirmar o diagnóstico e padronizar a resposta patológica.

Foram avaliadas as seguintes características dos pacientes: gênero, idade, tabagismo, história familiar de câncer gástrico, índice de massa corpórea (IMC), número de linfonodos total e comprometidos, tamanho do tumor, localização do tumor, tipo histológico de Laurén, tipo histológico da OMS, grau de diferenciação, estadiamento clínico (cTNM), tipo de quimioterapia perioperatória utilizada, se a quimioterapia realizada foi completa ou se houve redução da dose, tumor residual (R)*, extensão da gastrectomia (**) e gastrectomia ampliada (***)).

(*) Classificação do tumor residual (R)⁵⁶

RX – A presença de tumor residual não pode ser avaliada

R0 – Ausência de tumor residual

R1 – Tumor residual microscópico

R2 – Tumor residual macroscópico

(**) Extensão da gastrectomia⁵⁸

Gastrectomia total – remoção do todo o estômago.

Gastrectomia subtotal – remoção de 2/3 distais do estômago

(***) Gastrectomia ampliada⁵⁸

Entende-se por gastrectomia ampliada, todas as estruturas removidas, total ou parcialmente, junto com o tumor principal: baço, fígado, pâncreas, cólon transverso, mesocólon transverso, etc.

4.9.1 Avaliação patológica

O sistema de avaliação patológica do grau de regressão tumoral utilizado foi o de Becker et al²⁷. Foram agrupadas para análise estatística as categorias 1a e 1b, como pacientes bom respondedores a quimioterapia e as categorias 2 e 3 como mau respondedores (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação de resposta patológica conforme Becker et al²⁷

Grau de Becker	Significado	Agrupamento
1a	Resposta patológica completa	Bom respondedor
1b	Resposta patológica quase completa (10% de células tumorais residuais)	
2	Resposta patológica parcial (10 - 50% de células tumorais residuais)	Mau respondedor
3	Resposta patológica mínima ou ausência de resposta	

4.9.2 Análise do vírus Epstein-Barr (EBV)

Hibridização *in situ* – EBER

A sonda INFORM EBER (sonda precoce do vírus Epstein-Barr) foi utilizada para identificar, por hibridização *in situ* e microscopia óptica, células que expressam o RNA codificado por vírus Epstein-Barr (EBV) em cortes de biópsia tumoral fixados em formalina e impregnadas em parafina tal como previamente descrito pelo grupo⁵⁹. A sonda INFORM EBER permite hibridização específica para transcrição do RNA do EBV.

Os cortes histológicos foram feitos em lâminas preparadas com uma espessura de 4 µm, sendo estas lâminas em seguida fixadas e desparafinadas em uma temperatura de 65° C por 1 hora. Cada teste da sonda INFORM EBER contém um coquetel de sondas de oligonucleotídeos marcados com fluoresceína em um diluente a base de formamida. A sonda (ISH iVIEWBlue) foi projetada para ser usada no instrumento BenchMark XT e BenchMark ULTRA. O Kit de detecção contém um anticorpo primário e um anticorpo secundário conjugado à biotina, conjugado à fosfatase alcalina (FA), que é usada como enzima cromogênica. Durante o processo de coloração azul de hibridização *in situ*, a sonda marcada com fluoresceína sofre hibridização contra sequências de RNA alvo em células ou tecidos. Após este passo, é adicionado um conjugado de enzima estreptavidina-FA que se liga à biotina presente no anticorpo secundário. A sonda marcada com fluoresceína é então visualizada como fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil (BCIP) e cromogênio nitro azul tetrazólio (NPT), que produz um precipitado azul facilmente identificado por microscopia óptica.

O protocolo de rotulagem consiste de várias etapas, nas quais os reagentes são incubados por períodos predeterminados a temperaturas específicas. No final de cada etapa

de incubação, o instrumento BenchMark XT ou BenchMark ULTRA lava as seções para remover o material não ligado e aplica um filme líquido que minimiza a evaporação dos reagentes aquosos da lâmina. Os resultados foram interpretados usando um microscópio, sendo considerado EBER positivo quando teve a coloração forte e difusa no núcleo das células neoplásicas e negativo quando não houve marcação nuclear. Todas as reações foram realizadas com controle externo positivo atestando o resultado encontrado.

4.9.3 Análise da Instabilidade de Microssatélite (MSI)

Extração de DNA tumoral

O DNA tumoral foi isolado a partir de cortes de biópsia tumoral fixados em formalina e impregnadas em parafina utilizando-se o kit de extração: QIAamp DNA Micro kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante e previamente publicada pelo grupo⁶⁰. Todo o material extraído foi posteriormente acondicionado a -30 °C para as posteriores análises moleculares.

Para o estudo de MSI, foi realizada uma reação de PCR em multiplex composto por 6 marcadores mononucleotídeos quasimonomórficos (NR27, NR21, NR24, BAT25, BAT26 e HSP110), segundo metodologia descrita previamente pelo nosso grupo e implementada na rotina do diagnóstico molecular do Hospital de Câncer de Barretos⁶⁰.

De maneira resumida, um par de primers para cada marcador foi adicionado à reação, sendo que o *primer forward* foi conjugado a moléculas fluorescentes: BAT26–FAM, BAT25–HEX, NR24–NED, NR21–FAM e NR27–HEX. Para a reação de PCR foi utilizado 1 µL de mix de *primers* em concentração de 10 mM. Além disso, 5 µL de Master Mix Multiplex (Qiagen), 3 µL de água e 1 µL de DNA com concentração de 50 ng/µL foram adicionados, totalizando um volume final de 10 µL. As condições de ciclagem no termociclador foram as seguintes: 95 °C por 15 minutos para a desnaturação inicial do DNA, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 90 s e 72 °C por 30 s que proporcionaram a desnaturação, o anelamento e a extensão, respectivamente. A extensão final foi proporcionada pela etapa de 72 °C por 40 minutos e temperatura de *stand by* de 4 °C.

Os produtos de PCR foram então preparados para a eletroforese capilar adicionando-se 1 µL do produto amplificado, 8,7 µL de Hi-Di Formamide (*Applied Biosystems*) e 0,3 µL de GeneScan 600 LIZ *size standard* (*Applied Biosystems*).

A análise de fragmentos dos produtos de PCR foi realizada no sistema 3500 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*). Os dados gerados pelo equipamento 3500 *Genetic Analyzer*

foram analisados pelo *software GeneMapper* versão 4 (*Applied Biosystems*). Para isso, cada marcador teve seu tamanho em pares de base (pb) pré-definido para que o status de MSI seja definido como: MSI-High (MSI-H, instabilidade em 2 ou mais marcadores); MSI-Low (MSI-L, instabilidade em 1 marcador) e estabilidade de microssatélite (MSS, ausência de instabilidade).

4.9.4 Análise da expressão proteica de E-caderina e p53 - Imunohistoquímica

Foram realizados cortes histológicos em lâminas silanizadas (carregadas positivamente) com a espessura de 3µm, estas lâminas foram fixadas e desparafinizadas em estufa de calor seco a 65°C durante 1h.

As reações de imunohistoquímica para a detecção das proteínas E-caderina e p53 foram realizadas em plataforma de automação Autostainer Link 48 – Agilent, Dako™, por meio de um sistema de detecção que utiliza multímetro acoplado ao HRP (Horse Radish Peroxidase). O Kit utilizado foi: EnVision Flex+, High pH (Link), Ref.: K8002. A recuperação antigênica foi realizada em módulo fechado de aquecimento (*PT Link, Pre-Treatment Module for Tissue Specimens*), utilizando uma solução TRIS/EDTA pH 9,0 aquecida à 97°C por 20 minutos. Os anticorpos utilizados foram o anticorpo monoclonal de rato Anti-p53 (DO-7), IR616, RTU e o anticorpo monoclonal de rato anti-E-Caderina (NCH-38), IS059, RTU, ambos foram incubados por 20 minutos, revelados por DAB e contrata corados com hematoxilina. Após as reações, as lâminas foram lavadas e desidratadas em gradiente crescente de etanol em seguida, lavadas em Xilol P.A para recebimento do meio de montagem orgânico (Dako Mounting Medium – Dako, Ref.: CS703), sendo aplicado 1 gota por lâmina e adicionado a lamínula na sequência, após a secagem as lâminas foram visualizadas em microscopia.

Para padronização da imunohistoquímica para categorizar os tipos da E-caderina e p53 seguimos o utilizado por Setia e col³¹. A expressão de p53 foi considerada aberrante (reflexo do gene *TP53* mutado) em duas formas de apresentação na imunohistoquímica, a nulo caracterizada pela ausência completa da coloração nuclear e a forte positivo caracterizado como o padrão de coloração em mais de 70% do núcleo das células analisadas. Por outro lado, foi considerado como p53 normal (reflexo do gene selvagem) qualquer coloração do núcleo celular até 70% das células analisadas³¹.

4.9.5 Classificações dos subtipos moleculares de adenocarcinoma gástrico

Utilizamos para estas classificações dois algoritmos: o proposto por Setia et al³¹ (figura 4) que dividiu os adenocarcinomas gástricos em 5 subtipos moleculares: grupo EBV, MSI, E-caderina, p53 aberrante e p53 normal. Além deste, usamos o algoritmo descrito por Gonzales et al³² (figura 5) que classificou-os nos mesmos subtipos do TCGA: grupo EBV, MSI, CIN e GS.

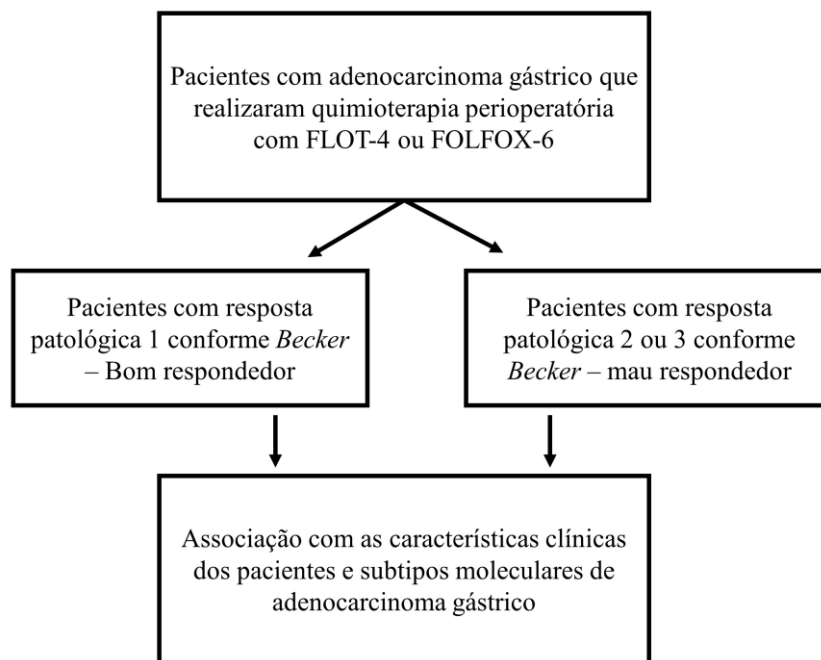


Figura 7 - Fluxograma do estudo

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados na ficha previamente definida e padronizada foram inseridos na plataforma REDCap e posteriormente a análise estatística foi realizada utilizando o programa *IBM-SPSS 27.0 for Windows®*.

A estatística descritiva (média, mediana, desvio padrão, mínimo, máximo e tabelas de frequências) foi utilizada para a caracterização da amostra.

A relação entre a resposta patológica, os subtipos moleculares de adenocarcinoma gástrico e as características dos pacientes foram verificadas entre si através do teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher para variáveis categóricas e teste T ou Mann-Whitney para variáveis numéricas e ambas as variáveis independentes, dependendo da característica de Normalidade dos dados. O nível de significância adotado foi de 5%.

6 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto está de acordo com a Declaração de Helsinki, encontra-se cadastrado na plataforma Brasil e foi aprovado pelo comitê de ética local (Hospital de Câncer de Barretos) sob o número CAAE 15379619.7.0000.5437.

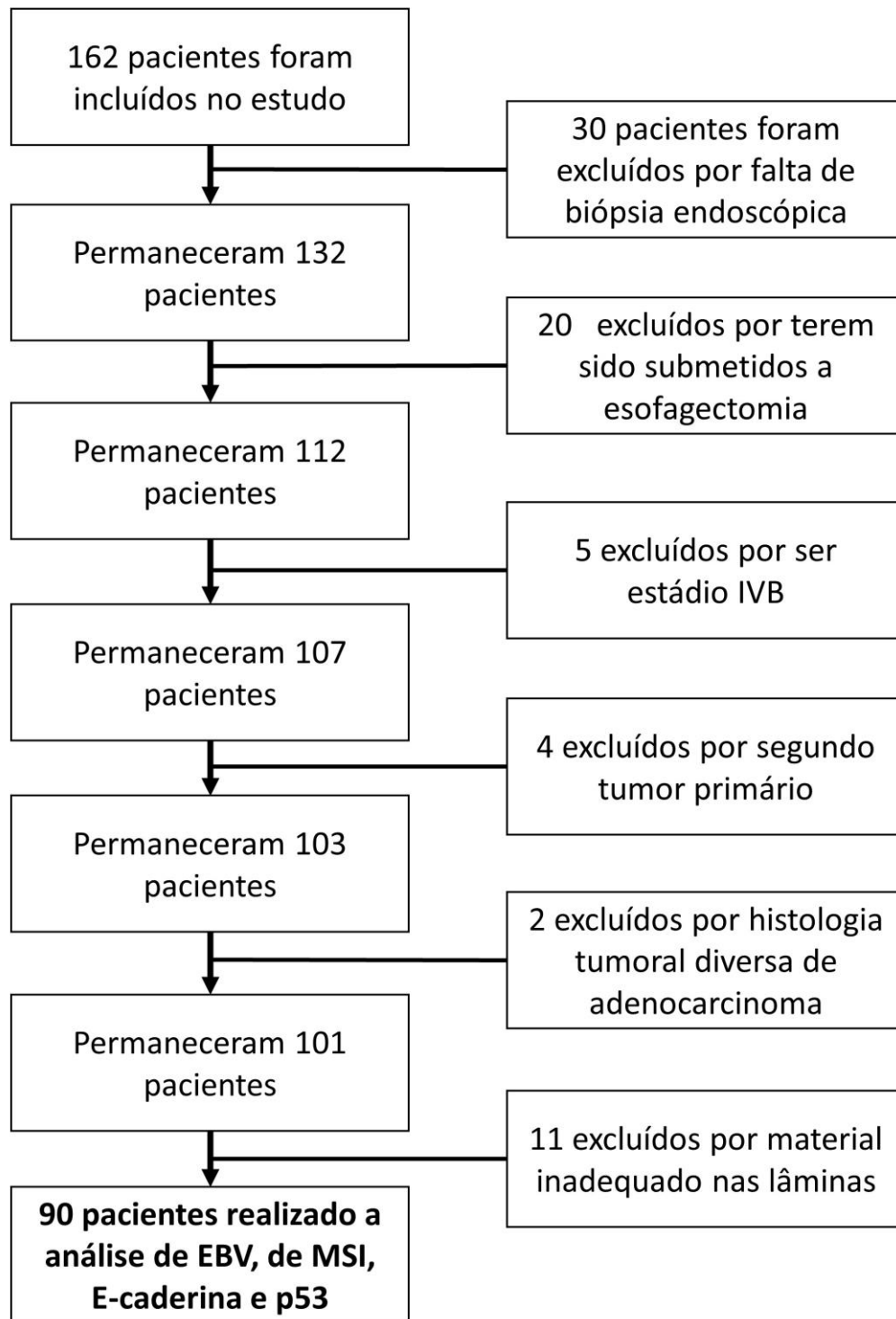
7 RESULTADOS

Foram identificados 162 pacientes que realizaram quimioterapia perioperatória mais cirurgia por adenocarcinoma gástrico no período de 2017 – 2019.

Destes, 30 pacientes foram excluídos do estudo por falta de biópsia endoscópica pré-quimioterápica disponível no hospital, 20 pacientes foram excluídos por terem sido submetidos a esofagectomia, 5 por serem estágio IVB, 4 por apresentarem segundo tumor primário e 2 por apresentarem histologia tumoral diversa de adenocarcinoma no anátomo-patológico definitivo (1 tumor neuroendócrino e 1 carcinoma medular) (Figura 7).

Dos 101 pacientes participantes do estudo, 11 foram excluídos por falta de material adequado nas lâminas das biópsias endoscópicas, sendo que em 90 pacientes foram realizadas as análises do EBV, MSI, E-caderina e p53.

Foram coletados, armazenados no Redcap e feito as análises dos dados destes pacientes.



EBV = vírus Epstein-Barr; MSI – instabilidade de microsatélite.

Figura 8 - Descrição das exclusões

7.1 Características demográficas, clínicas e cirúrgicas

O sumário das principais características demográficas, clínico-patológicas e cirúrgicas está evidenciado na Tabela 2.

A idade mínima dos 90 pacientes na primeira consulta foi de 27 anos, a máxima de 76 com uma mediana de 59. Sobre o gênero, 56 (62,2%) pacientes eram masculinos. Em relação a cor da pele, 61 (67,8%) pacientes eram da cor branca. No que diz respeito ao índice de massa corpórea, o mínimo foi de 15,4 e o máximo de 45 com uma mediana de 24. A história familiar de câncer gástrico foi positiva em 16 (17,8%) pacientes. 44 (48,9%) pacientes nunca foram tabagistas. O Índice de Karnofsky foi 90% na primeira consulta em 72 (80%) pacientes. O antro gástrico foi o epicentro tumoral em 36 (40%) casos, seguido pelo corpo gástrico em 34 (37,8%) casos e transição esôfago-gástrica. Em relação aos dados das biópsias endoscópicas, 40 (44,4%) pacientes apresentaram o subtipo adenocarcinoma gástrico intestinal de Laurén, em 29 (32,2%) o subtipo tubular moderadamente diferenciado da OMS e em 53 (58,9%) pacientes, grau 3 de diferenciação. Quanto ao estadiamento clínico tomográfico, 48 (53,3%) pacientes, foram estadiados como III. No que diz respeito a quimioterapia utilizada, 50 (55,6%) pacientes utilizaram FLOT, enquanto 40 (44,4%) FOLFOX. Quase todos os pacientes conseguiram realizar a fase pré-operatória completa, 97,8%. Houve redução da dose da quimioterapia utilizada em 4 (4,4%) pacientes. Em 72 (80%) pacientes foi realizada a gastrectomia total. O tipo de linfadenectomia foi D2 em 86 (95,6%) pacientes. A ressecção foi considerada R0 em 86 (95,6%) pacientes. A mediana do tamanho do tumor foi de 31mm, variando de 0 (resposta completa) a 110mm. Quanto aos linfonodos, a mediana dos dissecados foi de 26,5 por paciente, com mínimo de 7 e máxima de 100. Entre os linfonodos comprometidos, a mediana por paciente foi de 0, variando de 0 a 23(Tabela 2).

Tabela 2 - Características demográficas, clínico-patológicas e cirúrgicas

Variável	Número	%
Idade(anos)		
Mediana (mín-máx)	59,2 (27-76,8)	
Gênero		
Masculino	56	62,2%
Feminino	34	37,8%
Cor da pele		
Branca	61	67,8%
Preta	5	5,5%
Parda	24	26,7%
IMC		
Mediana(mín-máx)	24,3 (15,4-45)	
História familiar Câncer gástrico		
Sim	16	17,8%
Não	74	82,2%
Tabagista		
Sim	25	27,8%
Não	44	48,9%
Ex-tabagista	21	23,3%
Índice de Karnofsky		
80%	17	18,9%
90%	72	80,0%
100%	1	1,1%
Localização do tumor		
TEG	20	22,2%
Corpo gástrico	34	37,8%
Antro gástrico	36	40,0%
Classificação de Laurén		
Intestinal	40	44,4%
Difuso	29	32,2%
Misto	15	16,7%
Não consta	6	6,7%
Classificação da OMS		
Tubular bem diferenciado	5	5,6%
Tubular moderadamente diferenciado	29	32,2%
Tubular sólido	10	11,1%
Pouco coeso com células anel de sinete	24	26,7%
Pouco coeso com outras células	5	5,6%
Misto	16	17,7%
Outros	1	1,1%

Continua...

Continuação...

Variável	Número	%
Grau tumoral		
G1	6	6,7%
G2	31	34,4%
G3	53	58,9%
Estádio clínico tomográfico 8º Ed, UICC/AJCC 2017		
I	3	3,3%
IIA	3	3,3%
IIB	29	32,2%
III	48	53,3%
IVA	7	7,8%
Quimioterapia perioperatória		
FOLFOX	40	44,4%
FLOT	50	55,6%
Fase pré-operatória		
Completa	88	97,8%
Incompleta	2	2,2%
Houve redução da dose da QT		
Sim	4	4,4%
Não	86	95,6%
Tipo de gastrectomia		
Total	72	80,0%
Subtotal	18	20,0%
Tipo de linfadenectomia		
D1 plus	4	4,4%
D2	86	95,6%
Tipo de ressecção		
R0	86	95,6%
R1	3	3,3%
R2	1	1,1%
Tamanho do tumor (mm)		
Mediana(mín-máx)	31 (0-110)	
Número de linfonodos dissecados		
Mediana(mín-máx)	26,5 (7-100)	
Número de linfonodos comprometidos		
Mediana(mín-máx)	0 (0-23)	

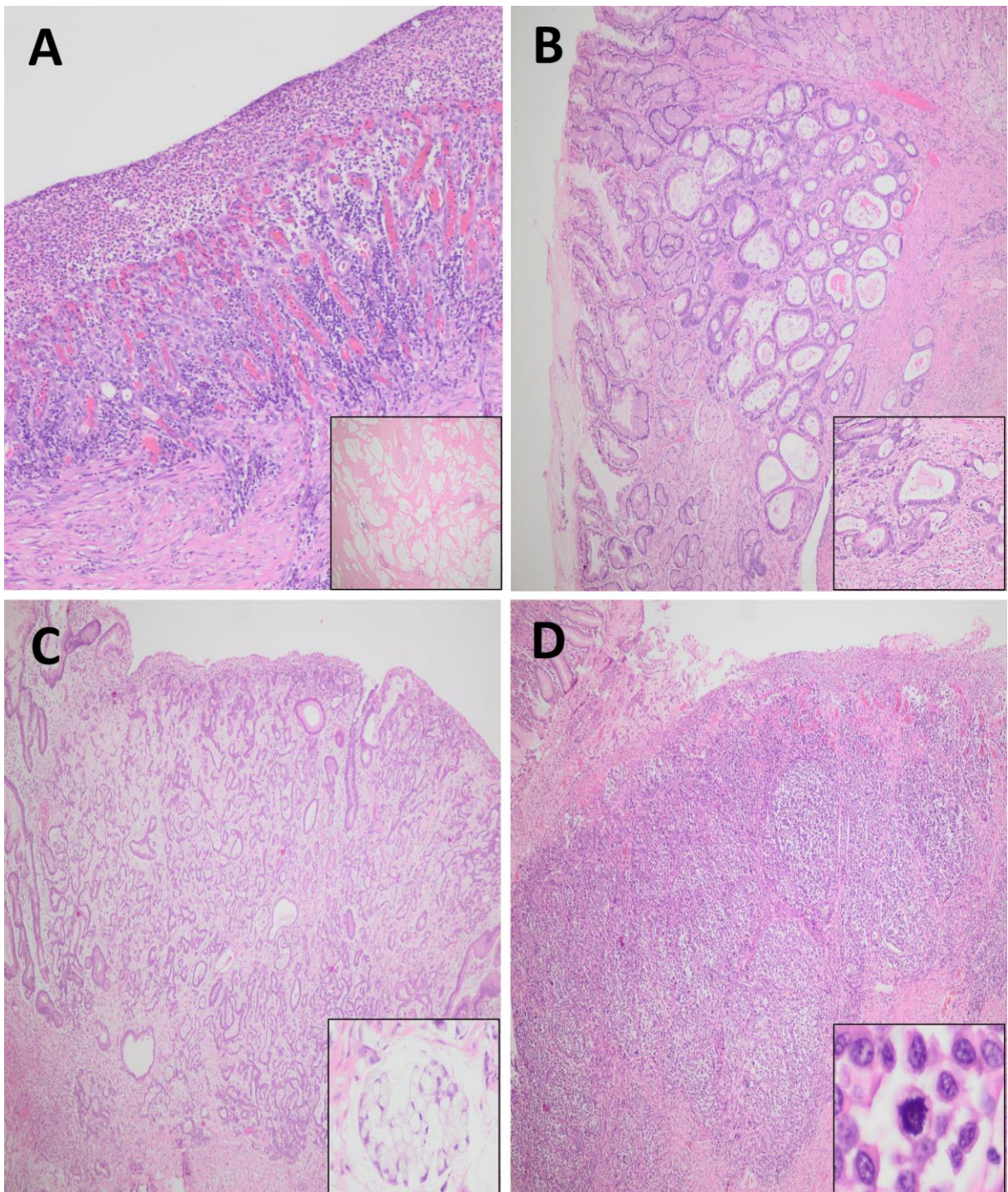
IMC = índice de massa corpórea; TEG = transição esôfago-gástrica; QT = quimioterapia.

7.2 Descrição da resposta patológica conforme Becker e agrupada

A avaliação de Becker evidenciou 9 (10%) pacientes com resposta patológica completa, grau 1a de Becker (figura 9A), 14 (15,6%) pacientes apresentaram grau de resposta 1B (figura 9B), 29 (32,2%) pacientes grau 2 (figura 9C) e 38 (42,2%) pacientes grau 3 (figura 9D) (Tabela 3). Quando agrupados conforme a resposta patológica obtida, 23 (25,6%) pacientes foram bom respondedores a quimioterapia e 67 (74,4%) mau respondedores (Tabela 3).

Tabela 3 - Descrição da resposta patológica

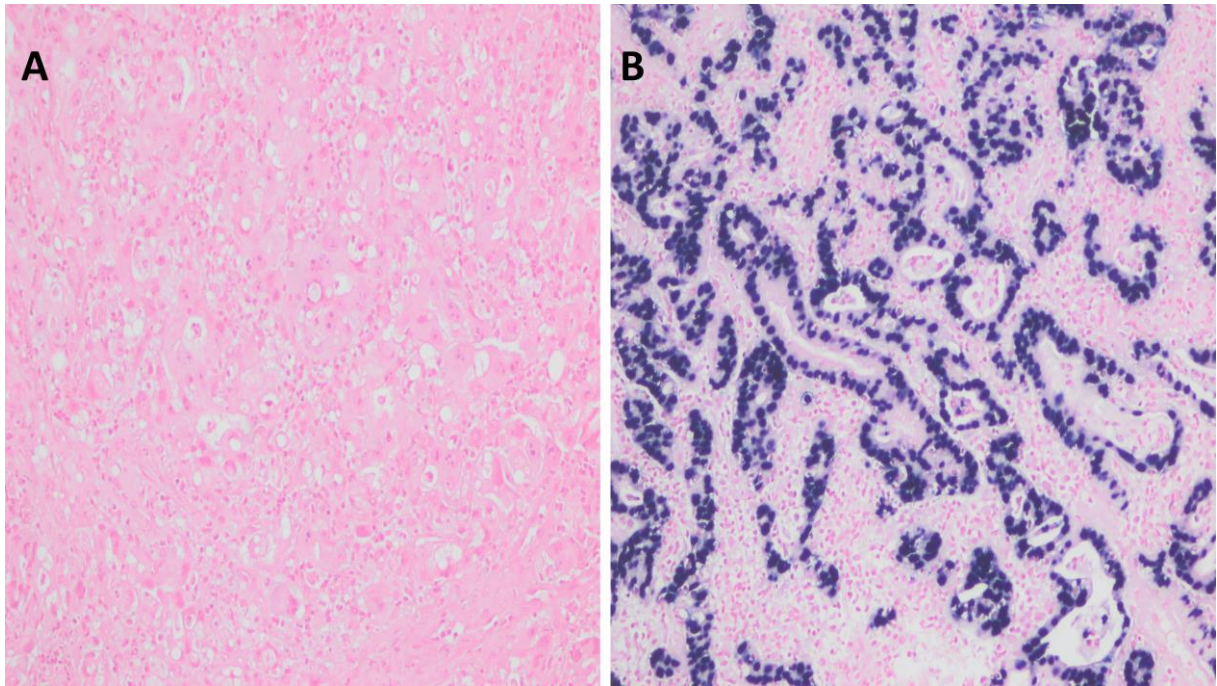
Variável	Número	%
Resposta patológica conforme Becker		
1a	9	10%
1b	14	15,6%
2	29	32,2%
3	38	42,2%
Resposta patológica agrupada		
Bom respondedor	23	25,6%
Mau respondedor	67	74,4%



Fotos com HE (hematoxilina e eosina). **A** - *Becker 1a* = ulceração, sem tumor (100x aumento); insert = lagos de mucina (400x); **B** - *Becker 1b* = tumor residual (200x); insert = raras células de adenocarcinoma tubular (400x); **C** - *Becker 2* = 80% de tumor residual (40x); insert = lagos de mucina com células anel de sinete (200x); **D** - *Becker 3* = ulceração e 90% de tumor (40x); insert - mitose (400x).

Figura 9 - Classificação de Becker

Após, fomos avaliar a presença de EBV através da hibridização *in situ* (Figura 10). Entre os 90 pacientes avaliados, 80 (88,9%) foram EBV negativo (Figura 10A), e 10 (11,1%) pacientes apresentavam EBV positivo (Figura 10B) (Tabela 4).



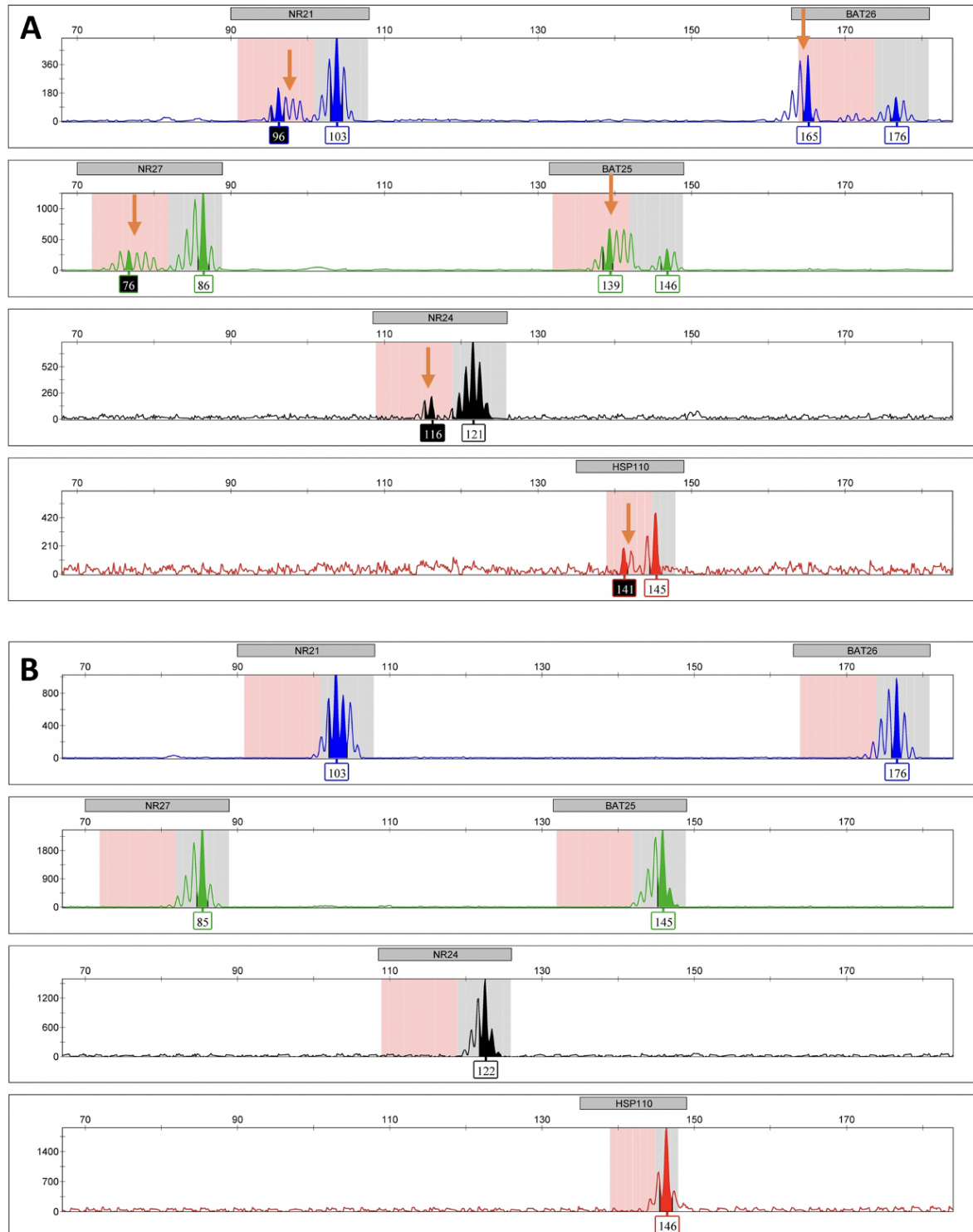
A – EBER (sonda precoce de vírus Epstein-Barr) negativo pela ausência de coloração azul no núcleo das células (200x aumento); **B** – EBER positivo com coloração azul no núcleo celular (200x).

Figura 10 - Hibridização *in situ* com EBER

Tabela 4 - Descrição do status de EBV, MSI, E-caderina e p53

Perfil molecular	Número (%)
Vírus Epstein-Barr (EBV)	
EBV positivo	10 (11,1)
EBV negativo	80 (88,9)
Instabilidade de microssatélite (MSI)	
MSI-H	9 (10)
MSI-L ou MSS	81 (90)
E-caderina	
Positivo	77 (85,6)
Negativo	13 (14,4)
p53	
normal	66 (73,3)
Aberrante nulo	11 (12,2)
Aberrante forte positivo	13 (14,5)

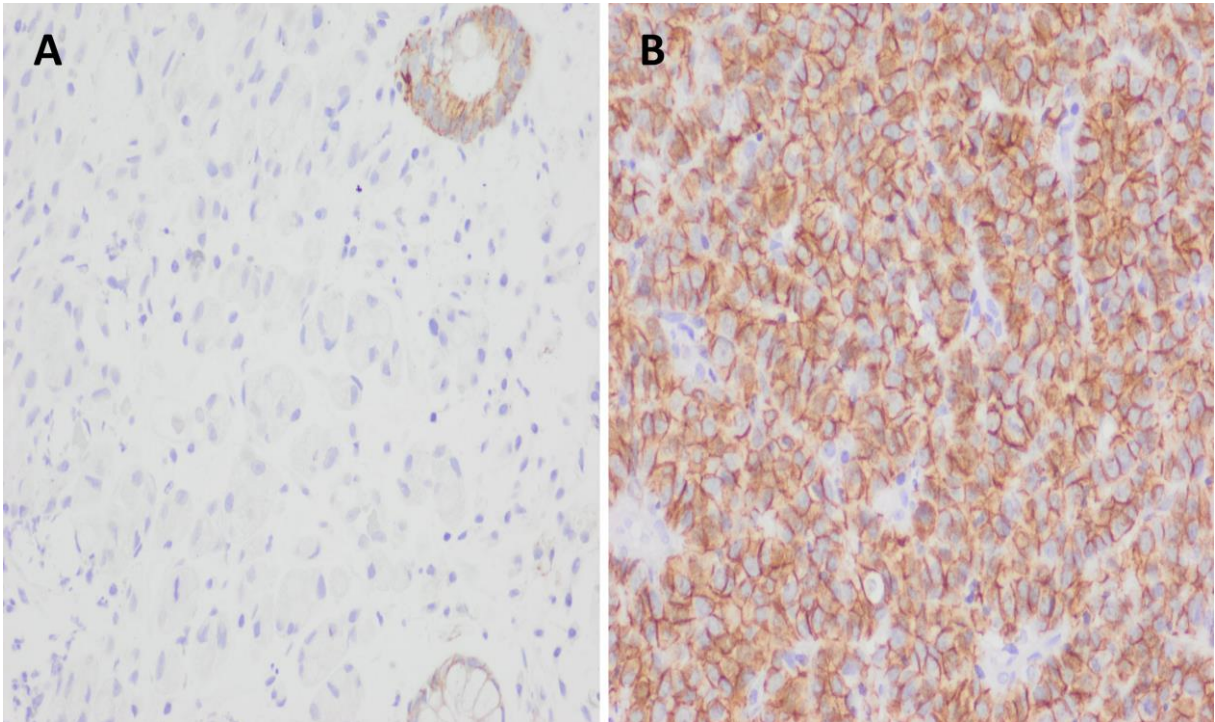
Os resultados da PCR relacionados a instabilidade de microsatélite (MSI) evidenciaram 9 (10%) pacientes com MSI-H (figura 11A) e 81 (90%) pacientes MSI-L ou MSS (Figura 11B) (Tabela 4).



A – MSI-H = presença de alelos instáveis (seta) nas regiões de microsatélite ; **B** – MSS = ausência de alelos instáveis nas regiões de microsatélites.

Figura 11 - PCR para MSI

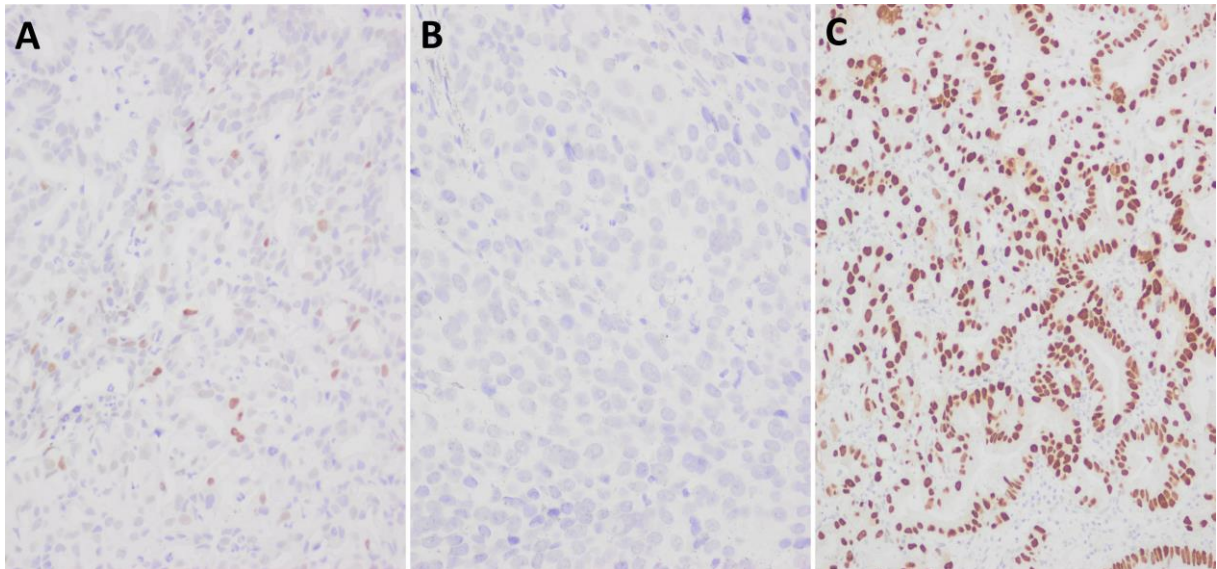
Relativamente à expressão da E-caderina, observamos em 13 (14,4%) pacientes perda de expressão, ou E-caderina negativa (Figura 12A), e 77 pacientes (85,6%) mantiveram a expressão positiva de E-caderina (Figura 12B) (Tabela 4).



A – Imunohistoquímica sem coloração na membrana celular (400x aumento); **B** – Presença de coloração da membrana celular (400x).

Figura 12 - Imunohistoquímica da E-caderina

Por fim, a avaliação imunohistoquímica de p53, evidenciou 66 pacientes (73,3%) com expressão normal de p53 (Figura 13A), 24 (26,7%) com expressão aberrante, nulo (Figura 13B) ou forte positivo (Figura 13C)(Tabela 4).



A – p53 na imunohistoquímica normal, coloração em menos que 70% dos núcleos celulares (400x); **B** – p53 aberrante nulo, ausência de coloração nos núcleos das células (400x); **C** – p53 forte positivo, coloração nuclear em mais de 70% das células (200x).

Figura 13 - Imunohistoquímica de p53

7.3 Associação dos biomarcadores com as características clínicas e patológicas

Em seguida, associamos a presença e expressão dos biomarcadores com as características clínicas e patológicas (Tabela 5).

A análise estatística evidenciou uma associação significativa entre tumores EBV positivo com o subtipo tubular pela OMS ($p=0,031$), com tumores de maior tamanho tumoral (mediana de 52,5mm) versus 30 mm em tumores EBV negativos ($p=0,008$), bem como associação com mais linfonodos comprometidos (mediana de 1,5) quando comparados com o grupo EBV negativo (mediana 0) ($p=0,043$) (Tabela 5). Observamos uma tendência entre EBV negativo com subtipo difuso de Laurén ($p=0,057$) (Tabela 5). Não encontramos diferença estatística para as outras variáveis (Tabela 5).

Relacionado ao status de MSI, somente a idade ao diagnóstico foi significativamente distinta entre os grupos, sendo 61,7 anos no grupo MSI-H e 56,98 no grupo MSI-L ou MSS ($p=0,031$) (Tabela 5).

No que diz respeito a E-caderina, no grupo com expressão positiva 40 (51,9%) pacientes eram do subtipo intestinal de Laurén, enquanto no grupo com expressão negativa nenhum paciente foi do subtipo intestinal ($p=0,001$) (Tabela 5). Em relação ao subtipo tumoral da OMS na biópsia, no grupo com E-caderina negativa 39 (48,2%) foram do tipo tubular versus nenhum paciente no grupo com expressão negativa ($p=0,001$) (Tabela 5). Por fim, nos pacientes com E-caderina positiva, 40 (51,9%) pacientes apresentaram grau 3 na biópsia, enquanto no grupo E-caderina negativa todos foram grau 3 ($p=0,003$) (Tabela 5).

Sobre a análise de p53, a mediana do tamanho tumoral foi maior no grupo selvagem com 35mm versus 20mm no grupo aberrante ($p=0,007$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Associação do perfil de EBV, MSI, E-caderina e p53 com as características clínicas e patológicas.

Variável	Vírus Epstein-Barr(n)			Instabilidade de microssatélite(n)			E-caderina(n)			p53(n)		
	Positivo(10) n (%)	Negativo(80) n (%)	p	Alta(9) n (%)	Baixa/estável(81) n (%)	p	Positiva(77) n (%)	Negativa(13) n (%)	p	Aberrante(24) n (%)	Normal(66) n (%)	p
Média da idade	59,12	57,25	0,625	61,73	56,98	0,031*	57,6	56,57	0,749	60,78	56,24	0,073
Gênero												
Masculino	7 (70)	49 (61,3)	0,737	5 (55,6)	51 (63)	0,725	45 (58,4)	11 (84,6)	0,12	15 (62,5)	41 (62,1)	>0,99
Feminino	3 (30)	31 (38,8)		4 (44,4)	30 (37)		32 (41,6)	2 (15,4)		9 (37,5)	25 (37,9)	
Cor da pele												
Branca	8 (80)	53 (66,3)	0,491	5 (55,6)	56 (69,1)	0,462	53 (68,8)	8 (61,5)	0,749	17 (70,8)	44 (66,7)	0,802
Preta/parda	2 (20)	27 (33,7)		4 (44,4)	25 (30,9)		24 (31,2)	5 (38,5)		7 (29,2)	22 (33,3)	
Câncer gástrico familiar												
Sim	3 (30)	13 (16,3)	0,375	2 (22,2)	14 (17,3)	0,659	15 (19,5)	1 (7,7)	0,45	5 (20,8)	11 (16,7)	0,756
Não	7 (70)	67 (83,7)		7 (77,8)	67 (82,7)		62 (80,5)	12 (92,3)		19 (79,2)	55 (83,3)	
Tabagista												
Sim	5 (50)	20 (25)	0,222	3 (33,3)	22 (27,2)	0,903	20 (26)	5 (38,5)	0,585	9 (37,5)	16 (24,2)	0,272
Não	3 (30)	41 (51,3)		4 (44,5)	40 (49,3)		39 (50,6)	5 (38,5)		12 (50)	32 (48,5)	
Ex-tabagista	2 (20)	19 (23,7)		2 (22,2)	19 (23,5)		18 (23,4)	3 (23)		3 (12,5)	12 (17,3)	
Epicentro do tumor												
Distal	2 (20)	34 (43,6)	0,189	5 (55,6)	31 (39,2)	0,478	31 (41,3)	5 (38,5)	>0,99	10 (43,5)	26 (40)	0,809
Proximal	8 (80)	44 (56,4)		4 (44,4)	48 (60,8)		44 (58,7)	8 (61,5)		13 (56,5)	39 (60)	
Classificação tumoral de Laurén												
Intestinal	4 (40)	36 (45)	0,057	5 (55,6)	35 (43,2)	0,421	40 (51,9)	0 (0)	0,001*	14 (58,3)	26 (39,4)	0,395
Difuso	2 (20)	27 (33,7)		1 (11,1)	28 (34,6)		21 (27,3)	8 (61,5)		5 (20,8)	24 (36,4)	
Misto	1 (10)	14 (17,5)		2 (22,2)	13 (16)		11 (14,3)	4 (30,8)		4 (16,7)	11 (16,7)	
Outro/não consta	3 (30)	3 (3,8)		1 (11,1)	5 (6,2)		5 (6,5)	1 (7,7)		1 (4,2)	5 (7,5)	
Classificação tumoral OMS												
Tubular bem diferenciado	0 (0)	5 (6,3)	0,031*	0 (0)	5 (6,2)	0,273	5 (6,5)	0 (0)	0,001*	2 (8,3)	3 (4,5)	0,102
Tubular moderadamente diferenciado	2 (20)	27 (33,7)		4 (44,5)	25 (30,9)		29 (37,6)	0 (0)		10 (41,7)	19 (28,8)	
Tubular sólido	4 (40)	6 (7,5)		1 (11,1)	9 (11,1)		10 (13)	0 (0)		2 (8,3)	8 (12,2)	
Pouco coeso com células em anel de sinete	2 (20)	22 (27,5)		1 (11,1)	23 (28,4)		19 (24,7)	5 (38,5)		2 (8,3)	22 (33,3)	
Pouco coeso com outras células	0 (0)	5 (6,3)		0 (0)	5 (6,2)		2 (2,6)	3 (23)		3 (12,5)	2 (3)	
Misto	1 (10)	15 (18,7)		2 (22,2)	14 (17,3)		11 (14,3)	5 (38,5)		5 (20,9)	11 (16,7)	
Outros	1 (10)	0 (0)		1 (11,1)	0 (0)		1 (1,3)	0 (0)		0 (0)	1 (1,5)	
Grau do tumor												
G1	0 (0)	6 (7,5)	0,389	0 (0)	6 (7,4)	0,346	6 (7,8)	0 (0)	0,003*	2 (8,3)	4 (6,1)	0,584
G2	2 (20)	29 (36,3)		5 (55,6)	26 (32,1)		31 (40,3)	0 (0)		10 (41,7)	21 (31,8)	
G3	8 (80)	45 (56,2)		4 (44,4)	49 (60,5)		40 (51,9)	13 (100)		12 (50)	41 (62,1)	
Estadiamento clínico tomográfico												
I	0 (0)	3 (3,8)	0,797	0 (0)	3 (3,7)	0,817	3 (3,9)	0 (0)	0,363	0 (0)	3 (4,5)	0,556
IIA	0 (0)	3 (3,8)		0 (0)	3 (3,7)		3 (3,9)	0 (0)		2 (8,3)	1 (1,5)	
IIB	2 (20)	27 (33,7)		2 (22,2)	27 (33,3)		27 (35,1)	2 (15,4)		7 (29,2)	22 (33,3)	
III	7 (70)	41 (51,3)		6 (66,7)	42 (51,9)		39 (50,6)	9 (69,2)		13 (54,2)	35 (53)	
IVA	1 (10)	6 (7,4)		1 (11,1)	6 (7,4)		5 (6,5)	2 (15,4)		2 (8,3)	5 (7,7)	
Tamanho do tumor (mm)												
Mediana (mínimo-máximo)	52,5 (20 – 92)	30 (0 – 110)	0,008*	45 (0 – 90)	30 (0 – 110)	0,278	32 (0 – 110)	30 (2 – 92)	0,626	20 (0 – 88)	35 (0 – 110)	0,007*
Linfonodos locais comprometidos												
Mediana (mínimo-máximo)	1,5 (0 – 23)	0 (0 – 19)	0,039*	1 (0 – 7)	0 (0 – 23)	0,735	0 (0 – 23)	0 (0 – 12)	0,461	0 (0 – 10)	0,5 (0 – 23)	0,416

EBV = vírus Epstein-Barr; MSI = instabilidade de microssatélite; n = número; OMS – organização mundial da saúde; Negrito com * = valor p significativo.

A partir da definição dos marcadores, realizamos a classificação dos adenocarcinomas gástricos em subtipos moleculares conforme o proposto Gonzales et al³², substituta do TCGA. Encontramos 10 (11,1%) pacientes no grupo EBV, 8 (8,9%) no grupo MSI, 23 (25,6%) pacientes no grupo com instabilidade cromossomal e 49 (54,4%) no grupo com estabilidade genômica (Figura 14).

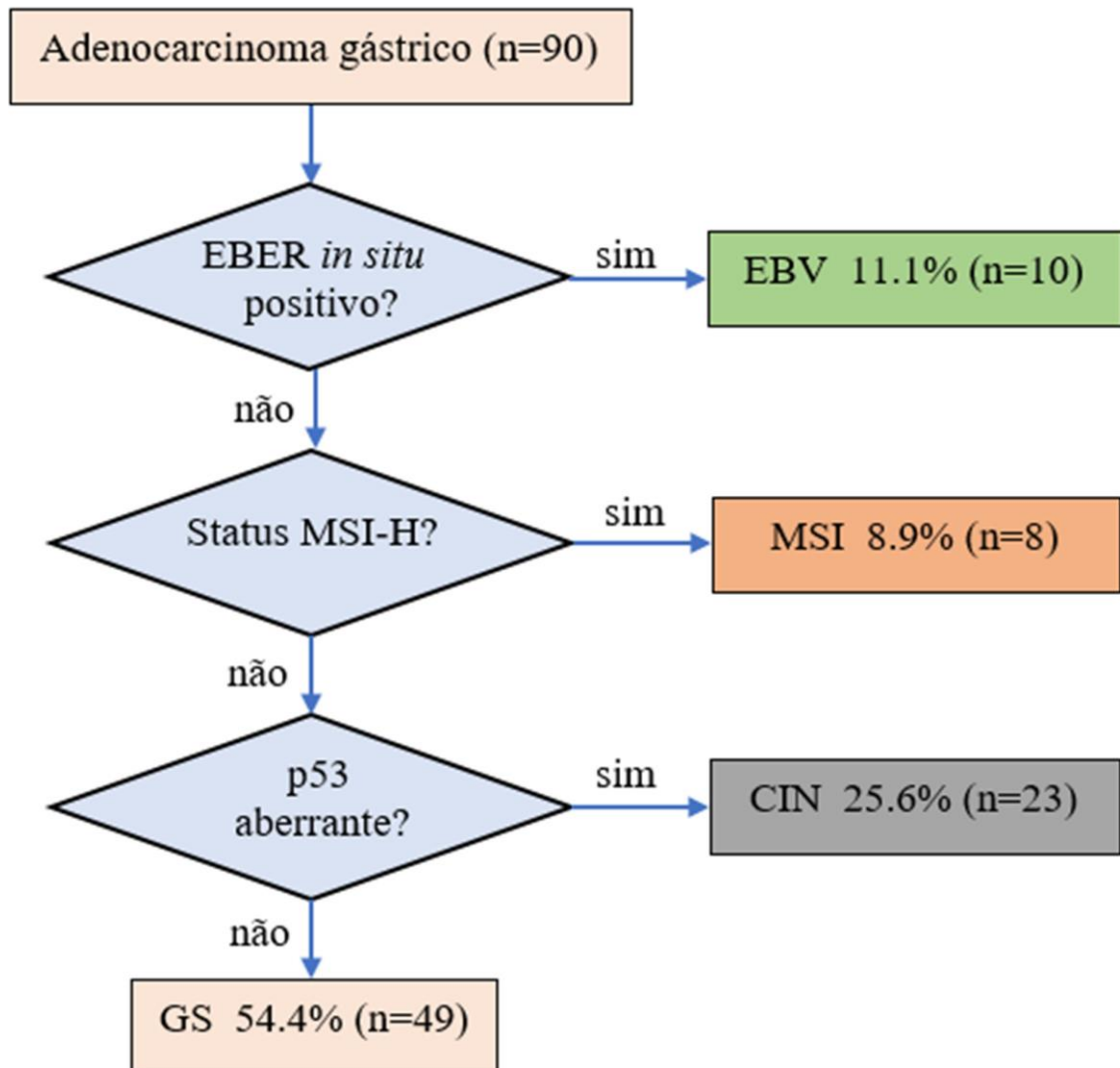


Figura 14 - Resultado dos subtipos moleculares substituto do TCGA segundo Gonzales et al³²

Ainda nesta etapa, classificamos os adenocarcinomas gástricos conforme a expressão proteica e de RNA sugerido por setia et al³¹. Entre os 90 pacientes: 10 (11,1%) foram do grupo EBV, 8 (8,9%) do grupo MSI, 11 (12,2%) pacientes do grupo E-caderina, 20 (22,2%) do grupo p53 aberrante e 41 (45,6%) do grupo p53 normal (Figura 15).

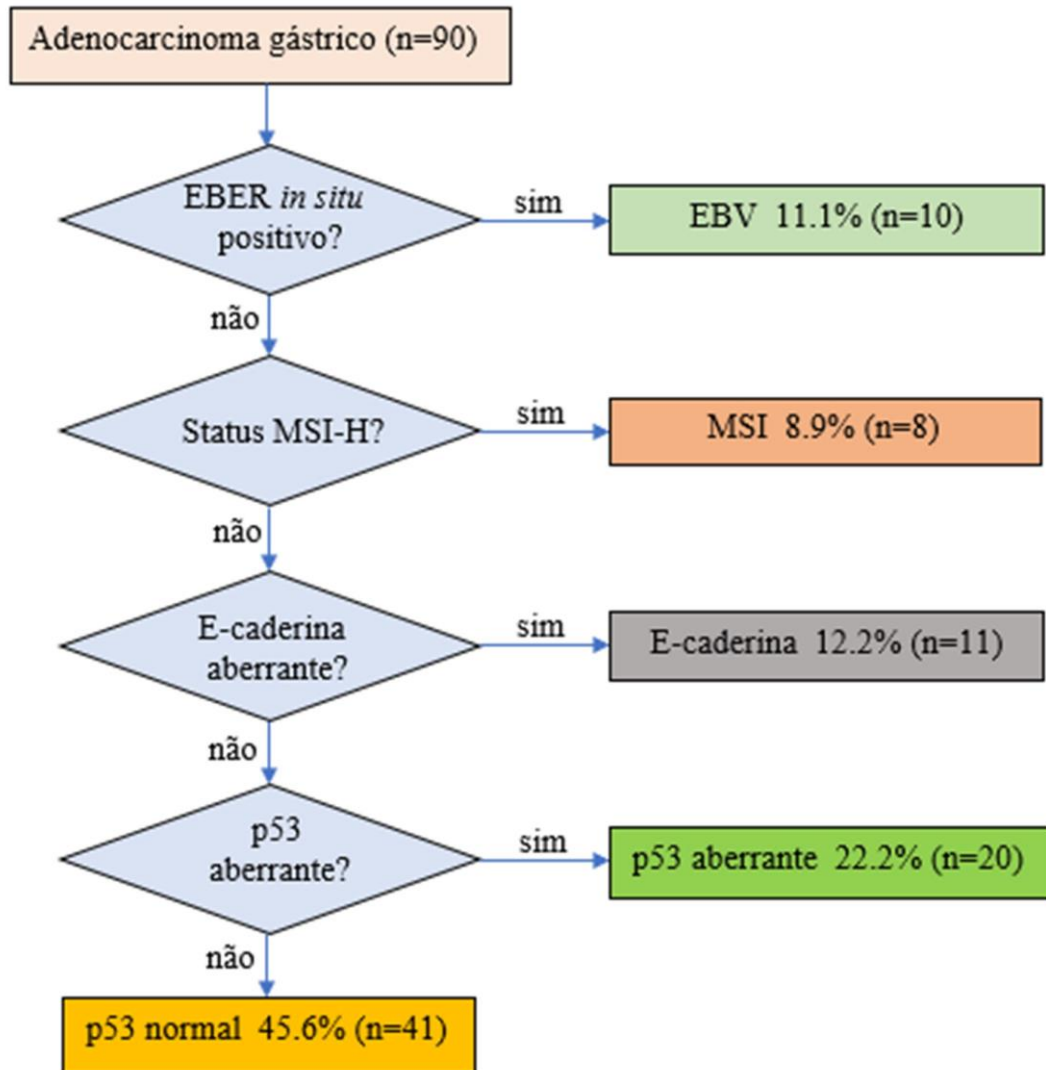


Figura 15 - Resultado dos subtipos moleculares segundo setia et al³¹

7.4 Associação da resposta patológica agrupada com o perfil de EBV, MSI, E-caderina, p53, com a características clínicas e patológicas e os subtipos moleculares de adenocarcinoma gástrico

Finalmente, realizamos a associação da resposta patológica agrupada conforme *Becker* com os marcadores moleculares, com os dois subtipos moleculares de adenocarcinoma gástrico e as características clínicas e patológicas (Tabela 6).

Estatisticamente, 7 (30,4%) pacientes bom respondedores a quimioterapia foram p53 aberrante forte positivo versus 6 (9%) no grupo mau respondedor ($p=0,042$) (Tabela 6). O subtipo histológico de Laurén e da OMS na biópsia endoscópica predominante entre os bom respondedores foi, respectivamente, o intestinal e o tubular, encontrado em 15 (65,2%) e 17 (73,9%) pacientes, de outra forma, no grupo mau respondedor 25 (37,3%) pacientes foram do subtipo intestinal e 27 (40,3%) do subtipo tubular ($p=0,020$ e $0,039$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Associação da resposta patológica agrupada com o perfil de EBV (vírus Epstein-Barr), MSI (instabilidade de microssatélite), E-caderina e p53, com as características clínicas e patológicas e os subtipos moleculares de adenocarcinoma gástrico.

Variável	Bom respondedor Número (%)	Mau respondedor Número (%)	p
Instabilidade de microssatélite			
MSI-H	2 (8,7)	7 (10,4)	>0,99
MSI-L ou MSS	21 (91,3)	60 (89,6)	
Perfil do Epstein-Barr vírus			
EBV positivo	3 (13)	7 (10,4)	0,712
EBV negativo	20 (87)	60 (89,6)	
E-caderina			
Positivo	21 (91,3)	56 (83,6)	0,502
Negativo	2 (8,7)	11 (16,4)	
p53			
Aberrante nulo	3 (13)	8 (11,9)	0,042*
Aberrante forte positivo	7 (30,4)	6 (9)	
Normal	13 (56,5)	53 (79,1)	
Classificação de Laurén			
Intestinal	15 (65,2)	25 (37,3)	0,020*
Difuso/Misto/Não consta	8 (34,8)	42 (62,7)	

Continua...

Continuação...

Classificação tumoral OMS			
Tubular bem diferenciado	1 (4,4)	4 (6)	
Tubular moderadamente diferenciado	11 (47,8)	18 (26,8)	
Tubular sólido	5 (21,7)	5 (7,5)	
Pouco coeso com células anel de sinete	3 (13)	21 (31,3)	0,039*
Pouco coeso com outras células	2 (8,7)	3 (4,5)	
Misto	1 (4,4)	15 (22,4)	
Outros	0 (0)	1 (1,5)	
Grau tumoral			
G1	1 (4,4)	5 (7,5)	
G2	11 (47,8)	20 (29,9)	0,322
G3	11 (47,8)	42 (62,8)	
Estadiamento clínico tomográfico			
I	0 (0)	3 (4,5)	
IIA	1 (4,3)	2 (3)	
IIB	8 (34,8)	21 (31,3)	0,903
III	13 (56,6)	35 (52,2)	
IVA	1 (4,3)	6 (9)	
Quimioterapia periop utilizada			
FOLFOX	13 (56,5)	27 (40,3)	0,226
FLOT	10 (43,5)	40 (59,7)	
Ciclos da fase pré-operatória			
Completo	22 (95,7)	66 (98,5)	0,448
Incompleto	1 (4,3)	1 (1,5)	
Redução da dose da QT utilizada			
Sim	2 (8,7)	2 (3)	0,269
Não	21 (91,3)	65 (97)	
Tipo da cirurgia			
Gastrectomia	20 (87)	51 (76,1)	0,379
Gastrectomia alargada	3 (13)	16 (23,9)	
Subtipo de adenocarcinoma TCGA			
EBV	3 (13)	7 (10,4)	
MSI	2 (8,7)	6 (9)	0,13
Instabilidade cromossomal	10 (43,5)	14 (20,9)	
Estabilidade genômica	8 (34,8)	40 (59,7)	
Subtipo baseado na expressão			
EBV	3 (13)	7 (10,4)	
MSI	2 (8,7)	6 (9)	
E-caderina aberrante	1 (4,3)	9 (13,4)	0,084
p53 normal	7 (30,4)	34 (50,8)	
p53 aberrante	10 (43,6)	11 (16,4)	

MSI-H = instabilidade de microssatélite alta; MSI-L = baixa; MSS – estabilidade de microssatélite; OMS = organização mundial da saúde; Negrito com * = valor p significativo.

8 DISCUSSÃO

Neste trabalho, realizamos a associação de resposta patológica de pacientes brasileiros com adenocarcinoma gástrico submetidos a quimioterapia perioperatória de um único centro de referência em tratamento oncológico, com os subtipos moleculares desta neoplasia determinados nas lâminas endoscópicas pré-quimioterapia.

Para a graduação da resposta patológica utilizamos os critérios de *Becker et al*²⁷, que utiliza como parâmetro a porcentagem de células tumorais residuais pós quimioterapia, sendo que todos os casos da nossa amostra foram revistos e classificados por um mesmo patologista especializado em neoplasias gástricas. Encontramos em 10% dos pacientes resposta patológica completa, valor que fica entre os dois estudos principais de quimioterapia perioperatória para adenocarcinoma gástrico. O estudo MAGIC¹⁹, atingiu resposta patológica completa em 6% dos pacientes tendo utilizado Epirrubicina, Cisplatina e 5-Fluorouracil. O estudo FLOT4-AIO²⁰, alcançou resposta patológica completa em 16% dos pacientes, ambos os trabalhos utilizaram os critérios de *Becker* para a graduação. No nosso trabalho, foi utilizado dois regimes de quimioterapia perioperatória FOLFOX-6 e FLOT-4, distinto dos trabalhos anteriores, e desta forma obtivemos resultado intermediário de resposta patológica. Verificamos que no subgrupo de pacientes bom respondedores, 56,5% utilizaram o regime FOLFOX-6, enquanto 43,5% o FLOT-4. Apesar desta diferença não ser estatística, sabe-se que o regime FOLFOX-6 é menos tóxico porque contém menos um quimioterápico, o Docetaxel, que é presente no regime FLOT-4.

O adenocarcinoma gástrico é uma doença heterogênea, com vários subtipos histológicos e moleculares (figura 6). Para a presente série, realizamos a revisão histológica de acordo com as principais classificações, incluindo a última classificação da OMS. Encontramos em 48,9% dos pacientes o subtipo tubular, sendo 32,2% moderadamente diferenciado.

Para os subtipos moleculares, utilizamos marcadores atualmente aceitos para uma aproximação às classificações moleculares, utilizando metodologias disponíveis na rotina de laboratórios de patologia.

Um dos primeiros marcadores avaliados foi o EBV por hibridização *in situ*. Encontramos 11,1% dos pacientes positivos para EBV. Esta frequência está em consonância com a literatura. Uma metanálise⁶¹ de 2014 composta por 13 estudos e 4599 pacientes com adenocarcinoma gástrico, encontrou uma prevalência de 8,9%. No TGCA²⁸, a prevalência foi de 9%. No estudo

CLASSIC⁴¹, 7% eram EBV positivo e em um estudo⁴² brasileiro foi encontrado 10% de positividade. Esta concordância de frequência, pode provavelmente ser devido a uniformidade do método diagnóstico (hibridização *in situ*), além da alta prevalência (90%) de infecção latente pelo EBV no mundo^{37, 40}.

Verificamos que a presença de EBV esteve significativamente associada ao subtipo tubular da OMS, tamanho e número de linfonodos comprometidos. Um trabalho⁴² brasileiro também encontrou a mesma associação de tumores maiores em pacientes EBV. Além disso, verificamos que os pacientes EBV positivos eram mais frequentes no gênero masculino (70%), apresentaram tumores na parte proximal gástrica (80%) e grau 3 nas biópsias endoscópicas, no entanto, os valores não foram significativos. Os trabalhos de Hewitt et al⁶² e de Kohlruess et al⁶³ que associaram o perfil positivo para EBV com as características dos pacientes, mostraram que estes são mais comuns em pacientes mais jovens, gênero masculino, atingem a parte proximal do estômago, são do tipo intestinal de Laurén e mais indiferenciados. Acreditamos que as diferenças de nossos achados possam em parte ser devido ao relativo pequeno tamanho amostral do nosso estudo.

Outro biomarcador central na classificação molecular é a instabilidade de microssatélite (MSI). Na nossa série, encontramos MSI-H em 10% dos pacientes. A frequência de MSI na literatura variou de 6 a mais de 20%^{28, 64}. A maior metanálise⁶⁵ de 2018 que associou MSI e adenocarcinoma gástrico através da análise de 48 estudos e com 18612 pacientes encontrou MSI-H em 9,2%. Outra metanálise⁴⁶ de 2019 com 1556 pacientes submetidos a quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante para adenocarcinoma gástrico encontrou MSI-H em 7,8%. No estudo MAGIC⁴⁴ em 2017, 6,6% dos casos foram MSI-H, já no CLASSIC⁴¹ na Ásia em 2019 a frequência foi de 6,7%. Um estudo em população alemã semelhante ao presente estudo encontrou uma frequência de 8,9%⁴⁵ e recente trabalho do grupo em população marroquina a frequência identificada foi de 13,4%⁶⁶. Estes valores são inferiores aos descritos no TCGA, com 22%²⁸, assim como em trabalho no Brasil que encontrou MSI em 18,5%⁴². Esta diferença de valores de MSI-H pode ser explicada aos estudos serem com diferentes populações, bem como os diversos métodos empregados para a determinação do status de MSI, que variou entre molecular e por imunohistoquímica.

Ao realizarmos a associação do MSI com as características dos pacientes, detectamos predomínio significativo de MSI-H nos pacientes idosos. Apesar de não encontrarmos outras associações estatísticas, observamos que os pacientes MSI-H apresentaram tumores

localizados mais na parte distal gástrica, sendo a maior parte do subtipo intestinal de Laurén, subtipo tubular da OMS e tumores maiores, quando comparado estas características com os pacientes MSI-L/MSS. Os nossos achados são similares à literatura. A maior metanálise⁶⁵ sobre este tópico encontrou associação estatística dos pacientes MSI-H com idade avançada, gênero feminino, localização distal e subtipo intestinal de Laurén. Em um estudo⁴² brasileiro os pacientes MSI-H eram mais velhos, gênero feminino, localização distal e tipo intestinal, assim como outros estudos^{28, 29, 46, 63, 67}.

Após a análise da imunohistoquímica para a E-caderina, evidenciamos ela negativa em 13 (14,4%) pacientes. Nestes, não foi encontrado e de maneira significativa nenhum subtipo tumoral intestinal de Laurén ou tubular da OMS. Além disso, todos os pacientes no grupo E-caderina negativa apresentaram tumores grau 3. Estes achados vão ao encontro da literatura. O trabalho de Setia et al apresentou uma prevalência de pacientes E-caderina negativa em 21%³¹, enquanto um trabalho brasileiro encontrou a prevalência de 7,3%⁴². Gao et al⁶⁸ também encontraram tumores mais indiferenciados no grupo com E-caderina negativa.

Um dos marcadores que apresenta maior diferença metodológica para definição do tipo normal ou aberrante é o p53. Nós utilizamos nesta série a mesma padronização utilizada por Setia et al³¹. Assim, consideramos o p53 normal como qualquer coloração do núcleo celular tumoral na imunohistoquímica de até 70%, de outra forma o aberrante foi dividido em dois subgrupos: o nulo, com ausência de coloração nuclear e o forte positivo, definido como coloração nuclear em mais de 70% das células tumorais. Desta forma, encontramos em 24 (26,7%) pacientes p53 aberrante, sendo associado significativamente apenas ao maior tamanho tumoral. Ramos et al⁴², encontraram uma prevalência de p53 aberrante de 35,4%, sendo esta de 38% e 51% nos respectivos trabalhos^{31, 32} de classificação molecular de adenocarcinoma gástrico. Estas diferenças são devidas as prováveis diferenças de padrão na definição da coloração pela imunohistoquímica dos tipos aberrante e normal, além da variação entre patologistas responsáveis pelo diagnóstico.

Após a definição e agrupamento dos pacientes conforme a resposta patológica, verificamos a associação significativa dos pacientes bom respondedores com o subtipo intestinal de Laurén e tubular da OMS. Da mesma forma, quando desmembramos os subtipos aberrantes do p53, foi encontrado esta associação com os pacientes aberrante forte positivo. Este achado vai ao encontro de uma metanálise⁵⁵ com 564 pacientes que avaliou a relação entre o perfil p53 e a resposta a quimioterapia neoadjuvante em pacientes com

adenocarcinoma gástrico. Eles encontraram que o p53 aberrante prediz uma boa resposta a quimioterapia nestes pacientes. Um trabalho brasileiro sobre adenocarcinoma gástrico, encontrou a associação de melhor sobrevida nos pacientes com p53 aberrante que receberam quimioterapia e cirurgia versus aos que foram submetidos a apenas cirurgia⁴². Desta maneira, podemos considerar o p53 aberrante, principalmente o forte positivo, com um bom marcador de resposta à quimioterapia.

Sobre o perfil de EBV e MSI e sua associação com resposta patológica não encontramos diferença significativa. Um trabalho alemão com dois centros participantes com 760 casos, dos quais 143 foram submetidos a quimioterapia perioperatória e cirurgia, tentou associar a eficácia de 5-fluorouracil e o perfil de MSI e EBV no contexto perioperatório em pacientes com adenocarcinoma de estômago e transição esôfago-gástrica (TEG). Eles não encontraram associação entre quimioterapia e resposta patológica nos pacientes EBV positivo ou MSI-H, porém encontraram associação de bom respondedor a quimioterapia no grupo MSI-L⁶³. Outro trabalho alemão, de Heidelberg, com 101 pacientes com adenocarcinoma gástrico e TEG avaliou a relação entre o perfil de MSI com resposta patológica e sobrevida. Não encontrou diferença estatística quanto a resposta patológica entre os grupos MSI-H ou MSI-L/MSS, sendo que apenas 1 dos 9 pacientes MSI-H do estudo foi bom respondedor⁴⁵. Apesar destes dois últimos estudos não mostrarem associação do perfil MSI-H e EBV positivo com a resposta patológica, em ambos, estes subgrupos tiveram melhor sobrevida global^{45, 63}.

Embora não seja o foco do nosso trabalho, vale mencionar que o fato de não encontrarmos associação entre o perfil de MSI e EBV com a resposta patológica após a quimioterapia pré-operatória, não podemos afirmar que estes pacientes não devam receber quimioterapia, muito menos que tenham um prognóstico pior. Vários trabalhos^{28, 41, 63, 67}, inclusive o TGCA, mostraram que os subtipos de adenocarcinoma gástrico EBV positivo e MSI-H apresentam melhor prognóstico. Em relação a eficácia da quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante nestes subgrupos, permanecem controvérsias. As perspectivas apontam para um provável grupo de pacientes EBV positivo e também MSI-H com benefício a imunoterapia, mesmo no cenário pré-operatório^{28, 69}.

O presente estudo apresenta várias novidades importantes, os perfis de EBV, MSI, E-caderina, p53, bem como a classificação tumoral foi realizado nas lâminas das biópsias endoscópicas, ou seja, sem interferência quimioterápica. Desta forma, pode ser reproduzível para a utilização na prática clínica. Salientamos que, apesar de não termos encontrado a

associação dos subtipos moleculares com a resposta patológica, esta descoberta dos marcadores nas biópsias endoscópicas e consequente classificação molecular impactaria na decisão terapêutica de pacientes que são submetidos a quimioterapia perioperatória ou cirurgia de princípio.

Outro ponto de destaque, é que a classificação de resposta patológica foi realizada por patologistas especialistas em neoplasias gástricas. Além disso, foi evidenciada qualidade da técnica cirúrgica empregada, constatada pelo número de linfonodos dissecados e a porcentagem de ressecção R0.

Apesar dos achados interessantes, o estudo apresenta algumas limitações. Os dados foram provenientes apenas de pacientes operados, ou seja, os pacientes que foram submetidos a quimioterapia pré-operatória mas que não puderam ser operados por qualquer razão, não foram avaliados. Outra limitação se deve a ser um estudo retrospectivo, não randomizado, com um tamanho amostral não muito grande e a utilização de dois diferentes regimes quimioterápicos (FOLFOX-6 e FLOT-4).

9 CONCLUSÃO

Neste estudo, encontramos em 10% dos pacientes com adenocarcinoma gástrico resposta patológica completa a quimioterapia perioperatória.

A presença de MSI-H foi encontrada em 10% dos pacientes, 11,1% foram EBV positivo, sendo estes perfis estatisticamente associados a idade mais avançada, e ao maior tamanho tumoral e número de linfonodos comprometidos, respectivamente.

Encontramos a associação do subtipo tumoral intestinal de Laurén, tubular da OMS e pacientes com p53 aberrante forte positivo, com boa resposta patológica à quimioterapia pré-operatória. Não encontramos associação entre a resposta patológica e os subtipos moleculares de adenocarcinoma gástrico.

Esperamos e buscamos o desenvolvimento de novos marcadores preditivos de resposta patológica à quimioterapia, além de drogas alvos buscando um tratamento personalizado e mais eficaz aos pacientes com adenocarcinoma gástrico, principalmente nos subtipos moleculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. *Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. **CA Cancer J Clin**. 2021.
2. *Estimativa 2020: incidência de Câncer no Brasil*. [Internet]: INCA; 2020 [cited 26 maio]; Available from: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>.
3. Lauren PJAPMS. *The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma: an attempt at a histo-clinical classification*. 1965;64(1):31-49.
4. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. *The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system*. 2020;76(2):182.
5. Majeed W, Iftikhar A, Khaliq T, Aslam B, Muzaffar H, Atta K, et al. *Gastric Carcinoma: Recent Trends in Diagnostic Biomarkers and Molecular Targeted Therapies*. **Asian Pac J Cancer Prev**. 2016;17(7):3053-60.
6. Jacome AA, Sankarankutty AK, dos Santos JS. *Adjuvant therapy for gastric cancer: what have we learned since INT0116?* **World J Gastroenterol**. 2015;21(13):3850-9.
7. Reddavid R, Sofia S, Chiaro P, Colli F, Trapani R, Esposito L, et al. *Neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer. Is it a must or a fake?* **World J Gastroenterol**. 2018;24(2):274-89.
8. Xiong BH, Cheng Y, Ma L, Zhang CQ. *An updated meta-analysis of randomized controlled trial assessing the effect of neoadjuvant chemotherapy in advanced gastric cancer*. **Cancer Invest**. 2014;32(6):272-84.
9. Giampieri R, Del Prete M, Cantini L, Baleani MG, Bittoni A, Maccaroni E, et al. *Optimal management of resected gastric cancer*. **Cancer Manag Res**. 2018;10:1605-18.
10. Wohnrath DR, Araujo RLC. *D2 lymphadenectomy for gastric cancer as an independent prognostic factor of 10-year overall survival*. **Eur J Surg Oncol**. 2019;45(3):446-53.
11. Fujitani K. *Overview of adjuvant and neoadjuvant therapy for resectable gastric cancer in the East*. **Dig Surg**. 2013;30(2):119-29.
12. Wohnrath DR, Araujo RLC. *Positive node-ratio in curative-intent treatment for gastric cancer is a strong independent prognostic factor for 5-year overall survival*. **J Surg Oncol**. 2020;121(5):777-83.

13. Liu D, Lu M, Li J, Yang Z, Feng Q, Zhou M, et al. *The patterns and timing of recurrence after curative resection for gastric cancer in China*. 2016;14(1):305.
14. Chao J, Fuchs CS, Shitara K, Tabernero J, Muro K, Van Cutsem E, et al. *Assessment of Pembrolizumab Therapy for the Treatment of Microsatellite Instability–High Gastric or Gastroesophageal Junction Cancer Among Patients in the KEYNOTE-059, KEYNOTE-061, and KEYNOTE-062 Clinical Trials*. 2021;7(6):895-902.
15. Boku N, Ryu M, Oh D, Oh S, Chung H, Lee K, et al. *Nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone in patients with previously untreated advanced or recurrent gastric/gastroesophageal junction (G/GEJ) cancer: ATTRACTION-4 (ONO-4538-37) study*. 2020;31(Suppl 4):S1142-S215.
16. Moehler M, Shitara K, Garrido M, Salman P, Shen L, Wyrwicz L, et al. *LBA6_PR Nivolumab (nivo) plus chemotherapy (chemo) versus chemo as first-line (1L) treatment for advanced gastric cancer/gastroesophageal junction cancer (GC/GEJC)/esophageal adenocarcinoma (EAC): First results of the CheckMate 649 study*. 2020;31:S1191.
17. Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, et al. *Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction*. 2001;345(10):725-30.
18. Long B, Yu ZY, Li Q, Du HR, Wang ZJ, Zhan H, et al. *A systematic review and network meta-analysis protocol of neoadjuvant treatments for patients with gastric cancer*. **Medicine (Baltimore)**. 2018;97(15):e0392.
19. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJ, Nicolson M, et al. *Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer*. **N Engl J Med**. 2006;355(1):11-20.
20. Al-Batran SE, Hofheinz RD, Pauligk C, Kopp HG, Haag GM, Luley KB, et al. *Histopathological regression after neoadjuvant docetaxel, oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin versus epirubicin, cisplatin, and fluorouracil or capecitabine in patients with resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4-AIO): results from the phase 2 part of a multicentre, open-label, randomised phase 2/3 trial*. **Lancet Oncol**. 2016;17(12):1697-708.
21. Ychou M, Boige V, Pignon JP, Conroy T, Bouche O, Lebreton G, et al. *Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial*. **J Clin Oncol**. 2011;29(13):1715-21.
22. Al-Batran S-E, Homann N, Schmalenberg H, Kopp H-G, Haag GM, Luley KB, et al. *Perioperative chemotherapy with docetaxel, oxaliplatin, and fluorouracil/leucovorin (FLOT) versus epirubicin, cisplatin, and fluorouracil or capecitabine (ECF/ECX) for resectable gastric or gastroesophageal junction*

(GEJ) adenocarcinoma (FLOT4-AIO): A multicenter, randomized phase 3 trial. **American Society of Clinical Oncology**; 2017.

23. Li ZY, Koh CE, Bu ZD, Wu AW, Zhang LH, Wu XJ, et al. Neoadjuvant chemotherapy with FOLFOX: improved outcomes in Chinese patients with locally advanced gastric cancer. **Journal of surgical oncology**. 2012;105(8):793-9.

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

25. Langer R, Becker KJVA. Tumor regression grading of gastrointestinal cancers after neoadjuvant therapy. 2018;472(2):175-86.

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

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

28. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature**. 2014;513(7517):202-9.

29. Birkman E-M, Mansuri N, Kurki S, Ålgars A, Lintunen M, Ristamäki R, et al. Gastric cancer: immunohistochemical classification of molecular subtypes and their association with clinicopathological characteristics. 2018;472(3):369-82.

30. Sohn BH, Hwang J-E, Jang H-J, Lee H-S, Oh SC, Shim J-J, et al. Clinical significance of four molecular subtypes of gastric cancer identified by the cancer genome atlas project. 2017;23(15):4441-9.

31. Setia N, Agoston AT, Han HS, Mullen JT, Duda DG, Clark JW, et al. A protein and mRNA expression-based classification of gastric cancer. 2016;29(7):772-84.

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

33. Seeneevassen L, Bessède E, Mégraud F, Lehours P, Dubus P, Varon CJIJoMS. Gastric Cancer: Advances in Carcinogenesis Research and New Therapeutic Strategies. 2021;22(7):3418.

34. Schulz C, Kullmann F, Kunzmann V, Fuchs M, Geissler M, Vehling-Kaiser U, et al. *N eo FLOT: Multicenter phase II study of perioperative chemotherapy in resectable adenocarcinoma of the gastroesophageal junction or gastric adenocarcinoma—Very good response predominantly in patients with intestinal type tumors. International journal of cancer.* 2015;137(3):678-85.
35. Duan S, Gong B, Wang P, Huang H, Luo L, Liu F. *Novel prognostic biomarkers of gastric cancer based on gene expression microarray: COL12A1, GSTA3, FGA and FGG. Mol Med Rep.* 2018;18(4):3727-36.
36. Bang Y-J, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. *Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial.* 2010;376(9742):687-97.
37. Shinozaki-Ushiku A, Kunita A, Fukayama MJJoo. *Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer.* 2015;46(4):1421-34.
38. Epstein MAJL. *Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma.* 1964;1:702-3.
39. Young LS, Rickinson ABJNRC. *Epstein–Barr virus: 40 years on.* 2004;4(10):757-68.
40. Morales-Sanchez A, M Fuentes-Panana EJCcdt. *Epstein-Barr virus-associated gastric cancer and potential mechanisms of oncogenesis.* 2017;17(6):534-54.
41. Roh CK, Choi YY, Choi S, Seo WJ, Cho M, Jang E, et al. *Single patient classifier assay, microsatellite instability, and epstein-barr virus status predict clinical outcomes in stage II/III gastric cancer: results from CLASSIC trial.* 2019;60(2):132-9.
42. Ramos MF, Pereira MA, Amorim LC, de Mello ES, Faraj SF, Ribeiro U, et al. *Gastric cancer molecular classification and adjuvant therapy: Is there a different benefit according to the subtype?* 2020;121(5):804-13.
43. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. *Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer.* 2003;349(3):247-57.
44. Smyth EC, Wotherspoon A, Peckitt C, Gonzalez D, Hulkki-Wilson S, Eltahir Z, et al. *Mismatch repair deficiency, microsatellite instability, and survival: an exploratory analysis of the Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy (MAGIC) trial.* 2017;3(9):1197-203.

45. Haag GM, Czink E, Ahadova A, Schmidt T, Sisic L, Blank S, et al. *Prognostic significance of microsatellite-instability in gastric and gastroesophageal junction cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy*. 2019;144(7):1697-703.
46. Pietrantonio F, Miceli R, Raimondi A, Kim YW, Kang WK, Langley RE, et al. *Individual Patient Data Meta-Analysis of the Value of Microsatellite Instability As a Biomarker in Gastric Cancer*. 2019.
47. Ilson DH. *Advances in the treatment of gastric cancer*. **Curr Opin Gastroenterol**. 2018;34(6):465-8.
48. Chan AOO. *E-cadherin in gastric cancer*. **World journal of gastroenterology: WJG**. 2006;12(2):199.
49. Shenoy S. *CDH1 (E-cadherin) mutation and gastric cancer: genetics, molecular mechanisms and guidelines for management*. **Cancer management and research**. 2019;11:10477.
50. Carneiro P, Fernandes MS, Figueiredo J, Caldeira J, Carvalho J, Pinheiro H, et al. *E-cadherin dysfunction in gastric cancer-Cellular consequences, clinical applications and open questions*. **FEBS letters**. 2012;586(18):2981-9.
51. Xing X, Tang YB, Yuan G, Wang Y, Wang J, Yang Y, et al. *The prognostic value of E-cadherin in gastric cancer: A meta-analysis*. **International journal of cancer**. 2013;132(11):2589-96.
52. Roviello F, Marrelli D, Vindigni C, De Stefano A, Spina D, Pinto E. *P53 accumulation is a prognostic factor in intestinal-type gastric carcinoma but not in the diffuse type*. **Annals of surgical oncology**. 1999;6(8):739-45.
53. Lane DP. *p53, guardian of the genome*. **Nature**. 1992;358(6381):15-6.
54. Wei K, Jiang L, Wei Y, Wang Y, Qian X, Dai Q, et al. *The prognostic significance of p53 expression in gastric cancer: a meta-analysis*. **J Cancer Res Clin Oncol**. 2015;141(4):735-48.
55. Xu H-Y, Xu W-L, Wang L-Q, Chen M-B, Shen H-LJPO. *Relationship between p53 status and response to chemotherapy in patients with gastric cancer: a meta-analysis*. 2014;9(4):e95371.
56. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumours*: **John Wiley & Sons**; 2017.
57. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. *Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support*. **J Biomed Inform**. 2009;42(2):377-81.

58. Gastric JGc. *Japanese classification of gastric carcinoma-2nd English edition*. 1998;1(1):10-24.
59. Nshizirungu JP, Bennis S, Mellouki I, Sekal M, Benajah D-A, Lahmidani N, et al. *Reproduction of the Cancer Genome Atlas (TCGA) and Asian Cancer Research Group (ACRG) Gastric Cancer Molecular Classifications and Their Association with Clinicopathological Characteristics and Overall Survival in Moroccan Patients*. 2021;2021.
60. Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, Duraes R, Antonio de Oliveira M, Guimaraes D, Reis RM. *Advantage of HSP110 (T17) marker inclusion for microsatellite instability (MSI) detection in colorectal cancer patients*. **Oncotarget**. 2018;9(47):28691-701.
61. Camargo MC, Kim W-H, Chiaravalli AM, Kim K-M, Corvalan AH, Matsuo K, et al. *Improved survival of gastric cancer with tumour Epstein–Barr virus positivity: an international pooled analysis*. 2014;63(2):236-43.
62. Hewitt L, Inam I, Saito Y, Yoshikawa T, Quaas A, Hoelscher A, et al. *Epstein-Barr virus and mismatch repair deficiency status differ between oesophageal and gastric cancer: a large multi-centre study*. 2018;94:104-14.
63. 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*. 2019;5(4):227-39.
64. Kim H, An JY, Noh SH, Shin SK, Lee YC, Kim HJ, et al. *High microsatellite instability predicts good prognosis in intestinal-type gastric cancers*. 2011;26(3):585-92.
65. 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*. 2018;105(3):159-67.
66. Nshizirungu JP, Bennis S, Mellouki I, Benajah D-A, Lahmidani N, El Bouhaddoutti H, et al. *Microsatellite Instability Analysis in Gastric Carcinomas of Moroccan Patients*. 2021;25(2):116-23.
67. Huang SC, Ng KF, Yeh TS, Cheng CT, Lin JS, Liu YJ, et al. *Subtraction of Epstein–Barr virus and microsatellite instability genotypes from the Lauren histotypes: Combined molecular and histologic subtyping with clinicopathological and prognostic significance validated in a cohort of 1,248 cases*. 2019;145(12):3218-30.
68. Gao H, Lan X, Li S, Xue YJT. *Relationships of MMP-9, E-cadherin, and VEGF expression with clinicopathological features and response to chemosensitivity in gastric cancer*. 2017;39(5):1010428317698368.

69. Kang BW, Baek DW, Kang H, Baek JH, Kim JGJAR. *Novel therapeutic approaches for epstein-barr virus associated gastric cancer*. 2019;39(8):4003-10.

ANEXO 1 - FICHA DE COLETA DE DADOS**Dados demográficos**

Número da Paciente na pesquisa:

Registro HCB:

Data de Nascimento: ___/___/___/

Data da Primeira Consulta: ___/___/___/

Idade na primeira consulta:

Índice de Karnofsky na primeira consulta:

Cor da pele:

Gênero: () Masculino () Feminino

Peso: Kg

Altura: cm

IMC:

Tabagismo: () sim () não () ex-tabagista

História familiar de câncer gástrico: () sim () não

ASA – () 1 () 2 () 3 () 4

Dados pré-operatórios e cirúrgicos

Subtipo Lauren na biópsia endoscópica:

Subtipo OMS na biópsia endoscópica

Grau na biópsia endoscópica:

Estadiamento clínico tomográfico agrupado 8ª edição

Quimioterapia perioperatória utilizada - () FOLFOX () FLOT

Fase neoadjuvante: () completa () incompleta

Se incompleta porquê

Fase adjuvante: () completa () incompleta

Data da Cirurgia: ___/___/___/

Tipo de cirurgia: () Ressecção gástrica isolada () Gastrectomia ampliada

Tipo de gastrectomia: () total () subtotal

Qual ressecção múltipla

Tipo de linfadectomia: () D1 () D1 plus () D2

Tipo de reconstrução: () B1 () B2 () Y de Roux

Tipo de ressecção: () R0 () R1 () R2

Estadiamento após neoadjuvância T:

Estadiamento após neoadjuvância N:

Estadiamento após neoadjuvância M:

Estadiamento agrupado após neoadjuvância

Epicentro do tumor: Transição esôfago-gástrica Fundo gástrico

Corpo gástrico Antro gástrico

Tamanho do tumor (maior medida – mm):

Nº linfonodos dissecados:

Nº linfonodos comprometidos:

Resposta patológica e perfil de EBV, MSI, E-caderina e p53

Resposta Patológica conforme Becker: 1a 1b 2 3

Resposta patológica agrupada: bom respondedor mal respondedor

EBV: positivo negativo

MSI: High Low ou MSS

E-caderina: positiva negativa

p53: normal aberrante nulo aberrante forte positivo