MARINA ALESSANDRA PEREIRA

**Vírus *Epstein-Barr*, instabilidade de microssatélite e expressão de PD-L1
nos adenocarcinomas gástricos: aspectos clínico-patológicos e prognósticos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Júnior

São Paulo

2018

MARINA ALESSANDRA PEREIRA

**Vírus *Epstein-Barr*, instabilidade de microssatélite e expressão de PD-L1
nos adenocarcinomas gástricos: aspectos clínico-patológicos e prognósticos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Júnior

São Paulo
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pereira, Marina Alessandra

Vírus Epstein-Barr, instabilidade de
microssatélite e expressão de PD-L1 nos
adenocarcinomas gástricos : aspectos clínico-
patológicos e prognósticos / Marina Alessandra
Pereira. -- São Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Ulysses Ribeiro Júnior.

Descritores: 1.Neoplasias gástricas
2.Carcinogênese 3.Herpêsvírus humano 4 4.Imuno-
histoquímica 5.Instabilidade de microssatélites
6.Biomarcadores 7.Prognóstico

USP/FM/DBD-214/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Júnior, meus eternos agradecimentos por toda a atenção e oportunidades que me deu ao longo desses anos. Sou grata pelo incentivo, apoio, interminável paciência, valiosos ensinamentos, por encarar com motivação o que eu via com desilusão – e pela presença constante em todos os momentos. Conservo uma admiração inalterável, e não esquecerei nunca – nunca, creia – sua dedicação e confiança em continuar a me acompanhar nesta jornada.

À Dra. Sheila Friedrich Faraj, por toda a ajuda concedida, incentivo, impecável organização, por compartilhar seu conhecimento, ouvir meus prantos nos piores momentos, mas acima de tudo pela amizade ao longo de todos esses anos. Um exemplo de profissional e de pessoa, a qual sem sua enorme dedicação e competência este trabalho não seria possível.

Ao Dr. Marcus Fernando Kodama Pertille Ramos, não apenas pela incondicional ajuda e apoio recebido, mas também pela amizade e pelo exemplo de competência e dedicação. Sua incomparável destreza, ensinamentos e valiosas sugestões enriqueceram o trabalho – e se fazem presentes durante todo o percurso que me levou até este. Obrigada por compartilhar longas horas de trabalho, pela confiança, bom humor, por ceder ouvidos aos meus discursos e questionamentos, e acima de tudo por ser um exemplo e incentivo a não me permitir desistir do que é difícil.

Ao Dr. André Roncon Dias – grande incentivo ao meu ingresso na pós-graduação e exemplo de determinação e competência profissional – agradeço sua sempre inestimável contribuição, honestidade absoluta, pelas longas revisões, risadas, cafés, conselhos, por escutar (muitos) desabafos e reclamações, e por me ajudar num dos momentos mais cruciais, demonstrando apoio e amizade que só uma grande pessoa poderia ter.

Ao Prof. Dr. Evandro Sobroza de Mello, por me receber tão bem no Departamento de Patologia, agradeço demais o seu sempre apoio, suporte e todos os ensinamentos durante todos esses anos. Obrigada por acreditar e nunca deixar que minhas ideias permanecessem no campo abstrato de serem “tão somente ideias”. Sua valorização às iniciativas científicas se faz único. Você tem meu o maior respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, pela oportunidade em ingressar no Departamento de Patologia do ICESP e pelo sempre valioso apoio e entusiasmo na execução de trabalhos científicos.

Ao Prof. Dr. Ivan Cecconello, pela oportunidade em trabalhar junto ao Departamento de Gastroenterologia.

Ao Prof. Dr. Bruno Zilberstein, pela confiança e valorização depositada na realização de projetos na área de estudo do câncer gástrico.

À Evelise Pelegrinelli Zaidan – sempre atenciosa e solícita – pelo enorme auxílio apoio e amizade ao longo desses anos. Mesmo quando sobrecarregada, nunca esteve “sem cabeça”. Sua motivação e seriedade com as coisas que assume são admiráveis.

Aos amigos Rodrigo Albergaria Réssio e Wagner Alves, pelo auxílio, companheirismo, risadas e convívio durante os quais guardo com carinho como os “melhores anos”.

À Ana Luiza Kerr Muzel Carpigiani, pelo seu sempre apoio, conselhos e encorajamento. Uma amiga para toda a vida, sempre pronta a me ouvir – e também para não ouvir se eu me exceder.

À amiga Cinthya dos Santos Cirqueira, pelo constante apoio e incentivo. Tenho-a como exemplo e grande referência de humildade e disciplina em pesquisa.

À Agatha Salles, que em pouco tempo muito se fez presente. Obrigada pela amizade (“*toppen*”), torcida, por encarar junto períodos difíceis, por sua alegria, por “botar reparo”, e pela sensibilidade em demonstrar apoio com a palavra certa no momento em que tudo parecia incerto.

À Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira, pelo auxílio com as reações imuno-histoquímicas e por manter as portas da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas sempre abertas.

À Alda Wakamatsu e Aline Kawassaki Assato, do Laboratório de Investigação Médica 14 (LIM-14) da Faculdade de Medicina da USP, pela enorme atenção e sempre prestatividade.

À Vilma Libério e Fabiana Soares, por todo o auxílio durante a pós-graduação.

Aos assistentes da Patologia, não só por esclarecer dúvidas e trazer seu conhecimento, mas pelo agradável convívio e por cada momento passado – partilhando suas experiências e dividindo risadas – sempre com a palavra amiga e incentivo certo. Vocês marcaram importante presença nessa etapa da minha vida, onde a palavra escrita não se faz suficiente para expressar o que eu teria a dizer. Admiro-os tanto quanto posso.

Aos residentes da patologia, pela sempre enriquecedora companhia, aprendizado, inúmeros cafés, trilhas sonoras horríveis, risadas, amizade e bom humor – tornando cada momento presente agradável apesar dos desafios, pressões e congelações. Vocês ocupam importante espaço nisso tudo - e cobrem de riso minha lembrança. De mim, fica uma estima profunda e uma amizade inalterável.

Aos amigos que passaram e aos que permanecem na Patologia – em especial à Maiara Vicente, Mariana Rossetto (“Mary”), Alceia Dias (“Jovem”), Ana Paula Martins (“Paulinha”), Camila Alves (“Camis”), Taiçara Del Porto, Vanesse Costa, Tamires Morales, Miyuki Issi (“Beth”) – pelo grande estímulo, risadas, festa, “bolo farofa” e companheirismo diário. Por tempos e períodos diferentes vocês me acompanharam nisso tudo, onde deste “tudo” guardo de cada um uma recordação de bons momentos e gestos do acaso, que sobre mim tiveram uma importância imensa.

À Lourdes Olivé, pelo apoio e incentivo desde sempre. Uma das pessoas mais incríveis que já conheci.

À Maria de Lourdes da Silva, por me acompanhar durante a vida e desejar minha felicidade como se fosse a sua.

Aos meus pais, por possibilitarem meus estudos e pelo apoio sempre dispensado ao longo da minha vida. Vocês me ensinaram a respeitar as pessoas; a valorizar as pessoas – permitindo que eu crescesse com a dose de teimosia necessária para questionar, furtar tempo senão ao que acredito, e confiar que meus sonhos são sempre mais belos que os da conveniência alheia...

A todos citados, deixo estas como as mais sinceras
extensões do meu “muito obrigada” (...)

M.A.D.

Necrópole de Gizé – Cairo, Egito. 2018

*"Todo ponto de visão é um ápice de uma pirâmide invertida,
cuja base é indeterminável."*

*Fernando Pessoa
Livro do Desassossego, 2ª ed - cap. 91.*

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta Dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Câncer gástrico.....	1
1.2. Carcinogênese gástrica.....	2
1.2.1. Fatores ambientais e genéticos	4
1.2.2. Alterações moleculares e progressão tumoral	6
1.2.2.1. Ativação de oncogenes	7
1.2.2.2. Inativação de genes supressores tumorais	8
1.2.2.3. Reativação da telomerase	9
1.3. Classificação molecular do câncer gástrico	9
1.4. Virus <i>Epstein-Barr</i>	11
1.4.1. Via de infecção: ciclo lítico e latente	11
1.4.2. Mecanismos de infecção pelo EBV: linfócitos e células epiteliais	13
1.4.3. EBV no câncer gástrico	14
1.4.4. Características clínicas e patológicas do câncer gástrico EBV-positivo.....	16
1.4.5. Alterações genéticas e epigenéticas induzidas pelo EBV	19
1.5. Instabilidade de microssatélite	21
1.5.1. Instabilidade de microssatélite no câncer gástrico	21
1.5.2. Características clínicas e patológicas do câncer gástrico com MSI	22
1.6. Proteína de morte celular programada (PD-L1).....	25
1.6.1. PD-L1 e o câncer gástrico	25

1.6.2. Características clínico-patológicas e prognósticas do câncer gástrico PD-L1-positivo.....	26
1.7. Perspectivas terapêuticas: EBV, MSI e PD-L1	26
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo principal	30
2.2. Objetivos Secundários.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Pacientes e amostras.....	32
3.1.1. Critérios de Inclusão.....	32
3.1.2. Considerações cirúrgicas e avaliação de seguimento	32
3.2. Desenho do estudo	33
3.3. Considerações Éticas.....	33
3.4. Variáveis clínico-patológicas	33
3.5. Confeção dos blocos de <i>tissue microarray</i>	35
3.6. Técnica histológica convencional	37
3.7. Reação imuno-histoquímica.....	38
3.7.1. Anticorpos primários e controles	39
3.7.2. Interpretação dos resultados imuno-histoquímicos	40
3.8. Detecção do vírus <i>Epstein-Barr</i> por hibridização <i>in situ</i>	40
3.9. Análise Estatística	41
4. RESULTADOS.....	44
4.1. Descrição da amostra	44
4.2. Dados de seguimento	47
4.3. Dados imuno-histoquímicos e expressão dos marcadores avaliados.....	47
4.4. Avaliação da infecção por EBV	49
4.4.1. EBV e características clínico-patológicas	51
4.4.2. EBV e sobrevida.....	53

4.5. Análise da imunexpressão das proteínas MMR	54
4.5.1. Fenótipo microssatélite instável e características clínico-patológicas	56
4.5.2. MSI e sobrevida.....	58
4.6. Análise da imunexpressão de PD-L1	59
4.6.1. Expressão global de PD-L1 e características clínico-patológicas	62
4.6.2. Expressão de PD-L1 e sobrevida	65
4.6.3. Expressão de PD-L1 no tumor e nas células imunes do infiltrado tumoral: características clínico-patológicas.....	66
4.6.4. Expressão de PD-L1 nas células tumorais, células do infiltrado inflamatório e sobrevida	69
4.6.5. Análise conjunta da sobrevida para os padrões de expressão de PD-L1.....	70
4.6.6. Correlação da expressão de PD-L1 com a presença de EBV e MSI.....	72
4.7. Síntese dos resultados IHQ	74
4.8. Análise conjunta dos grupos por perfil imuno-histoquímico e prognóstico	76
4.9. Avaliação dos fatores de impacto prognóstico no CG.....	78
5. DISCUSSÃO.....	82
6. CONCLUSÕES	97
7. REFERÊNCIAS	99
ANEXOS	111
A. Aprovação do projeto no Núcleo de Pesquisa	111
B. Aprovação do projeto de Banco de Dados no Núcleo de Pesquisa.....	113
C. Parecer do CEP – Plataforma Brasil	114
D. World Congress of Gastroenterology - WCOG at ACG2017.....	116
E. XIII Congresso Brasileiro de Cirurgia Oncológica, 2017 (CBCO)	117
F. Congresso: XVI SBAD 2017 - Semana Brasileira do Aparelho Digestivo	118
G. Apresentação na Reunião Geral das Disciplinas de Cirurgia do Aparelho Digestivo... 	119
H. SSO 2018 - Annual Cancer Symposium - Chicago.....	120
I. Artigo publicado.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASA	<i>American Society of Anesthesiologists</i>
CG	Câncer gástrico
CIMP	Fenótipo metilador de ilhas de CpG
CIN	Instabilidade cromossômica (" <i>chromosomal instability</i> ")
CpG	Citosina-fostato-guanina
DP	Desvio padrão
EBER	Antígeno nuclear do vírus <i>Epstein-Barr</i>
EBV	Vírus <i>Epstein-Barr</i>
EBVaGC	Carcinoma gástrico associado ao EBV
GCLS	Carcinoma gástrico com estroma linfóide
gp	Glicoproteína
HE	Coloração hematoxilina-eosina
HR	" <i>Hazard ratio</i> "
IHQ	Imuno-histoquímica
IMC	Índice de massa corpórea
ISH	Hibridização <i>in situ</i>
JGCA	<i>Japanese Gastric Cancer Association</i>
LB	Linfócitos B
LMP	Proteína latente de membrana
LN	Linfonodo
LNM	Metástase linfonodal
LT	Linfócitos T
MMR	Correção de erros de pareamento (" <i>mismatch repair</i> ")
MSI	Instabilidade de microssatélites (" <i>microsatellite instability</i> ")
MSIaGC	Carcinoma gástrico associado à MSI
MSI-H	Fenótipo microssatélite instável de alta frequência
MSI-L	Fenótipo microssatélite instável de baixa frequência
MSS	Fenótipo microssatélite estável
NLR	Razão neutrófilo-linfócito
PD-L1	Proteína de morte celular programada

SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
TC	Células tumorais (“ <i>tumor cells</i> ”)
TCGA	“ <i>The Cancer Genome Atlas</i> ”
TIIC	Células imunes do infiltrado tumoral (“ <i>tumor-infiltrating immune cells</i> ”)
TMA	Micromatriz tecidual (“ <i>tissue microarray</i> ”)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Programas de latência do EBV e propriedades oncogênicas dos produtos virais expressos.....	12
Tabela 2. Resumo das principais características clínico-patológicas do câncer gástrico EBV-positivo.	19
Tabela 3. Resumo das principais características clínico-patológicas do carcinoma gástrico com MSI.	24
Tabela 4. Características clínicas e cirúrgicas dos pacientes com câncer gástrico incluídos no estudo (n= 287).....	45
Tabela 5. Características anatomopatológicas dos pacientes com câncer gástrico incluídos no estudo (n= 287).....	46
Tabela 6. Características pós-operatórias dos pacientes com câncer gástrico incluídos no estudo (n= 287).....	47
Tabela 7. Resultados imuno-histoquímicos e percentuais de casos avaliados.	49
Tabela 8. Características clínicas dos pacientes com câncer gástrico de acordo com a presença de infecção pelo EBV.	51
Tabela 9. Características anatomopatológicas dos pacientes com câncer gástrico de acordo com a presença de infecção pelo EBV.	52
Tabela 10. Características clínicas dos pacientes com câncer gástrico de acordo com o status MSS/MSI.	56
Tabela 11. Características anatomopatológicas dos pacientes com câncer gástrico de acordo com o status MSS/MSI.	57
Tabela 12. Características clínicas dos pacientes com câncer gástrico de acordo com a expressão de PD-L1.....	63
Tabela 13. Características anatomopatológicas dos pacientes com câncer gástrico de acordo com a expressão de PD-L1.	64
Tabela 14. Características clínicas dos pacientes com câncer gástrico de acordo com a expressão de PD-L1 nas células tumorais (TCs) e nas células imunes do infiltrado tumoral (TIICs).	67
Tabela 15. Características anatomopatológicas dos pacientes com câncer gástrico de acordo com a expressão de PD-L1 nas células tumorais (TCs) e nas células imunes do infiltrado tumoral (TIICs).....	68

Tabela 16. Relação da expressão de PD-L1 com infecção por EBV e fenótipo MSI no câncer gástrico.	73
Tabela 17. Síntese dos resultados obtidos para a relação dos marcadores IHQ com as características clínico-patológicas.	75
Tabela 18. Síntese dos resultados de sobrevida obtidos para os marcadores IHQ avaliados..	76
Tabela 19. Análise univariada e multivariada dos fatores de risco de impacto na sobrevida livre de doença.....	79
Tabela 20. Análise univariada e multivariada dos fatores de risco de impacto na sobrevida global.	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Carcinogênese do adenocarcinoma tipo intestinal e difuso, e alterações genéticas e epigenéticas associadas.....	3
Figura 2. Transmissão de EBV mediada por contato célula a célula para células epiteliais...	14
Figura 3. Características morfológicas típicas do CG EBV-positivo.....	17
Figura 4. Frequência de alterações genéticas no CG EBV-positivo	20
Figura 5. Frequência de alterações genéticas no CG MSI	22
Figura 6. Características morfológicas típicas do CG com MSI.....	23
Figura 7. Equipamento utilizado para construção dos blocos de TMA.	36
Figura 8. Blocos de TMA com as amostras parafinadas de tumor e mucosa não-tumoral dos pacientes incluídos no estudo.	37
Figura 9. Lâminas de TMA coradas após reação de hibridização <i>in situ</i> (ISH) para EBV e imuno-histoquímica para as proteínas MMR.	41
Figura 10. Avaliação da presença de infecção por EBV no CG detectada pela técnica de hibridização <i>in situ</i> (EBER-ISH).....	50
Figura 11. CG EBV-positivo, com células tumorais exibindo intensa marcação nuclear (EBER-ISH).	50
Figura 12. Sobrevida livre de doença dos pacientes com CG EBV-positivo e EBV-negativo (Curva de <i>Kaplan-Meier</i> e teste de <i>Log-rank</i>).	53
Figura 13. Sobrevida global dos pacientes com CG EBV-positivo e EBV-negativos (Curva de <i>Kaplan-Meier</i> e teste de <i>Log-rank</i>).....	54
Figura 14. Reação imuno-histoquímica para avaliação da expressão das proteínas MMR	55
Figura 15. Caso com instabilidade de microssatélite (MLH-1 negativo) evidenciando ausência da expressão da proteína nas células tumorais.....	55
Figura 16. Sobrevida livre de doença dos pacientes com CG MSS e MSI (Curva de <i>Kaplan-Meier</i> e teste de <i>Log-rank</i>).	58
Figura 17. Sobrevida global dos pacientes com CG MSS e MSI (Curva de <i>Kaplan-Meier</i> e teste de <i>Log-rank</i>).....	59
Figura 18. Cilindros do TMA com amostra tumoral com reação imuno-histoquímica para PD-L1 negativa (spot esquerdo) e PD-L1 positiva (spot direito).....	60
Figura 19. Cortes histológicos, (a) carcinoma gástrico com estroma linfóide (HE) e (b) imunoexpressão do PD-L1 positivo nas células tumorais no respectivo caso	61

Figura 20. Cortes histológicos, (a) carcinoma gástrico com estroma linfóide (HE) e (b) imunoexpressão do PD-L1 positivo nas células tumorais e células imunes do infiltrado tumoral no respectivo caso (imagem inferior).....	62
Figura 21. Sobrevida livre de doença dos pacientes com CG PD-L1 positivo e PD-L1 negativo (Curva de <i>Kaplan-Meier</i> e teste de <i>Log-rank</i>).....	65
Figura 22. Sobrevida global dos pacientes com CG PD-L1 positivo e PD-L1 negativo (Curva de <i>Kaplan-Meier</i> e teste de <i>Log-rank</i>).....	66
Figura 23. Sobrevida livre de doença dos pacientes com CG PD-L1-positivo TC e PD-L1-negativo TC com metástase linfonodal (pN+).....	69
Figura 24. Sobrevida livre de doença dos pacientes com CG de acordo com o padrão de expressão do PD-L1 — (Curva de <i>Kaplan-Meier</i> e teste de <i>Log-rank</i>).....	71
Figura 25. Sobrevida livre de doença dos pacientes com CG de acordo com a expressão de PD-L1, ajustado para a presença de LNM — (Curva de <i>Kaplan-Meier</i> e teste de <i>Log-rank</i>)	71
Figura 26. Sobrevida global dos pacientes com CG de acordo com o padrão de expressão do PD-L1 — (Curva de <i>Kaplan-Meier</i> e teste de <i>Log-rank</i>).....	72
Figura 27. Pacientes com CG PD-L1 positivo e PD-L1-negativo de acordo com o perfil imuno-histoquímico.....	74
Figura 28. Pacientes com câncer gástrico de acordo com o perfil imuno-histoquímico.....	76
Figura 29. Sobrevida livre de doença dos pacientes com CG de acordo com o grupo IHQ (Curva de <i>Kaplan-Meier</i> e teste de <i>Log-rank</i>).	77
Figura 30. Sobrevida global dos pacientes com CG de acordo com o grupo IHQ — (Curva de <i>Kaplan-Meier</i> e teste de <i>Log-rank</i>)	78

RESUMO

Pereira MA. *Vírus Epstein-Barr, instabilidade de microssatélite e expressão de PD-L1 nos adenocarcinomas gástricos: aspectos clínico-patológicos e prognósticos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: O câncer gástrico (CG) foi recentemente categorizado em subtipos moleculares, os quais incluem os tumores *Epstein-Barr* (EBV)-positivo e com instabilidade de microssatélites (MSI). Esta distinção pode nos fornecer informações prognósticas e identificar alvos terapêuticos, tais como o PD-L1. **Objetivo:** O objetivo desse estudo foi avaliar a presença de EBV, MSI e expressão de PD-L1 no CG e suas associações com características clinicopatológicas e prognósticas. **Métodos:** Foram avaliados retrospectivamente 287 pacientes com CG submetidos à gastrectomia D2 com intenção curativa entre 2009 e 2016, através da técnica de *tissue microarray*. As proteínas de reparo do DNA (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) e o PD-L1 foram avaliados por imuno-histoquímica. O EBV foi avaliado por hibridação *in situ*. **Resultados:** Identificou-se a presença de EBV e MSI em 10,5% e 27% dos CGs, respectivamente. A maioria dos CGs com MSI apresentou perda simultânea da expressão de MLH1 e PMS2 (60%). O CG EBV-positivo associou-se ao sexo masculino ($p=0,032$), localização proximal ($p<0,001$), tipo indeterminado de *Lauren* ($p<0,001$), histologia pouco diferenciada ($p=0,043$) e infiltrado inflamatório acentuado ($p<0,001$). Os tumores com MSI foram associados à idade mais avançada ($p=0,002$), gastrectomia subtotal ($p=0,004$), pN0 ($p=0,024$) e ao estágio pTNM menos avançado ($p=0,020$). Observou-se a imunoexpressão de PD-L1 em 8,8% dos casos, com expressão predominante no CG EBV-positivo ($p<0,001$). O CG com MSI apresentou melhor sobrevida livre de doença ($p=0,006$) e sobrevida global ($p=0,049$) comparado ao EBV-negativo/microssatélite estável (MSS). Na análise multivariada, o status MSI/MSS permaneceu como fator de risco independente associado à recidiva da doença. **Conclusão:** O CG EBV-positivo apresentou aumento da expressão de PD-L1, enquanto o CG com MSI relacionou-se à melhor sobrevida. Ambos os subgrupos representam entidades distintas de CG e sua identificação é viável por técnicas diagnósticas convencionais. A caracterização destes subtipos de CG possibilita a aplicação de terapias direcionadas e permite ampliar o poder prognóstico dos atuais sistemas de classificação e estadiamento.

Descritores: neoplasias gástricas; carcinogênese; Herpesvírus humano 4; imuno-histoquímica; instabilidade de microssatélites; biomarcadores; prognóstico.

ABSTRACT

Pereira MA. *Epstein-Barr virus, microsatellite instability and PD-L1 expression in gastric adenocarcinomas: clinicopathological and prognostic aspects* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Introduction: Gastric cancer (GC) has recently been categorized in molecular subtypes, which include Epstein-Barr (EBV)-positive and microsatellite instable (MSI) tumors. This distinction provides prognostic information and identifies therapeutic targets, such as PD-L1.

Objective: The aim of this study was to evaluate the presence of EBV, MSI and PD-L1 expression in GC and their associations with clinicopathological characteristics and prognosis. **Methods:** We retrospectively evaluated 287 patients with GC who underwent D2-gastrectomy with curative intent from 2009 to 2016 through tissue microarray technique. DNA mismatch repair proteins (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) and PD-L1 were assessed by immunohistochemistry. EBV was detected by in situ hybridization. **Results:** The presence of EBV and MSI was identified in 10.5% and 27% of GCs, respectively. Most MSI GCs showed simultaneous loss of MLH1 and PMS2 expression (60%). EBV positivity was related to male ($p=0.032$), proximal location ($p<0.001$), undetermined Lauren type ($p<0.001$), poorly differentiated histology ($p=0.043$) and intense inflammatory infiltrate ($p<0.001$). MSI-tumors were associated with older age ($p=0.002$), subtotal gastrectomy ($p=0.004$), pN0 ($p=0.024$) and more initial pTNM stage ($p=0.020$). PD-L1 immunoexpression was observed in 8.8% of cases, with predominant expression in EBV-positive GC ($p<0.001$). MSI correlated with better disease-free survival ($p=0.006$) and overall survival ($p=0.049$) compared to the EBV-negative/microsatellite stable (MSS). In the multivariate analysis, the MSI/MSS status remained as independent risk factor associated with disease recurrence. **Conclusion:** EBV-positive GCs had increased PD-L1 expression, while MSI GC had better survival outcome. Both subgroups are distinct GC entities and their recognition is feasible by conventional diagnostic techniques. The characterization of these GC subtypes enables the application of targeted therapies and allows to extend the prognostic power of current classification and staging systems.

Descriptors: stomach neoplasms; carcinogenesis; herpesvirus 4, human; immunohistochemistry; microsatellite instability; biomarkers; prognosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer gástrico

O câncer gástrico (CG) é uma enfermidade de distribuição global, configurando-se como a quarta neoplasia mais frequente entre os homens e a quinta entre as mulheres. Com alta taxa de mortalidade, representa a terceira causa de morte por câncer no mundo em ambos os sexos (excluindo os tumores de pele não melanoma).¹

A estimativa mundial realizada pelo projeto Globocan/IARC apontou que 951.594 novos casos de CG e 723.073 mortes ocorreram em 2012.¹ No Brasil, para o biênio de 2016-2017 as estimativas de incidência de câncer de estômago previram o surgimento de 20.520 novos casos, sendo 12.920 em homens e 7.600 em mulheres.²

A incidência do CG varia de acordo com a localização geográfica, podendo a maior prevalência ser atribuída à exposição a fatores de risco, como variações regionais na dieta e incidência de infecções bacterianas e virais. Características relacionadas à predisposição genética das populações são também apontadas como responsáveis pelo quadro epidemiológico.¹⁻³

Taxas elevadas são encontradas nos países da Ásia Oriental, onde ocorrem cerca de 60% de todos os casos de CG. O Japão aparece como um dos países que apresenta maior número de casos, onde são encontrados até 78 doentes a cada 100 mil habitantes. Já em países da América do Norte e África essas taxas são inferiores, podendo representar cerca de 4 casos a cada 100 mil habitantes.²

Com relação ao tipo histológico, o adenocarcinoma é o tipo de tumor mais frequente, representando cerca de 90 a 95% dos casos. Outros tipos histológicos menos comuns são o linfoma, o tumor neuroendócrino e o tumor estromal do trato gastrointestinal (GIST).⁴

Nas últimas décadas, a incidência do CG tem diminuído em todo o mundo, o que pode ser atribuído a algumas mudanças de hábito — tais como melhor conservação dos alimentos, consumo de alimentos frescos e a redução de alimentos conservados no sal — e à diminuição na prevalência de infecção pelo *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Entretanto, apesar de tal redução nas taxas de incidência, a sobrevida dos pacientes com tumores avançados não melhorou significativamente no mesmo período.^{2, 4, 5}

Embora o tratamento cirúrgico através da gastrectomia associada à dissecação linfonodal mais ampla, e a adição de protocolos de quimioterapia e radioterapia tenham

melhorado a expectativa de vida, a mortalidade permanece ainda globalmente elevada, representando cerca de 9% de todas as mortes por câncer no mundo.¹

A sobrevida dos pacientes com CG depende principalmente da extensão da invasão tumoral, do comprometimento das estruturas adjacentes e da presença de metástases em nódulos linfáticos e outros órgãos distantes. Apesar da maioria dos casos em estágio inicial poderem ser curados através do tratamento cirúrgico, em estágios avançados as taxas de sobrevivência diminuem significativamente, aumentando a chance de metástase e risco de recidiva da doença.⁶

Recentemente, a caracterização do CG de acordo com seus aspectos moleculares tem se destacado como opção para melhor compreender a patogênese tumoral e melhorar os resultados clínicos. A definição de subtipos de tumores baseados no perfil de expressão gênica pode desempenhar papel importante na classificação dos tumores, previsão de prognóstico e no planejamento de tratamento adjuvante.^{7, 8}

Deste modo, a adição de uma nova estratégia de classificação molecular à classificação atual emerge como alternativa promissora para auxiliar a gestão da doença, sobretudo no que diz respeito à distinção dos tumores gástricos pela presença de infecção pelo vírus *Epstein-Barr* (EBV) e instabilidade de microssatélites (MSI). A definição destes subgrupos de tumores tem como base a complexa interação dos fatores genéticos e ambientais que contribuem para o desenvolvimento do CG.^{7, 8}

Assim, a estratificação do CG nos subtipos EBV-positivo e MSI pode fornecer informações mais detalhadas sobre a biologia do tumor, refletindo características e implicações prognósticas únicas que justifiquem a definição destes como dois tipos diferentes de doença.

1.2. Carcinogênese gástrica

A carcinogênese gástrica é um processo de múltiplas etapas resultado da exposição a vários fatores endógenos e exógenos. A maioria destes age no microambiente da mucosa gástrica por um prolongado período de tempo, ocasionando uma série de processos regenerativos onde a mucosa gástrica normal é alterada pela gastrite atrófica crônica, que progride para atrofia multifocal e metaplasia intestinal, seguida pela displasia que, ao final do processo, resulta no aparecimento do carcinoma (Figura 1).⁹

Vários genes são alvos de carcinógenos, e a ação destes fatores tem como consequência principal a geração de mutações que podem ocorrer em genes específicos que desempenham papéis importantes em diversas funções celulares, tais como adesão celular, transdução de sinal, diferenciação, desenvolvimento ou reparo do DNA. Assume-se que essas alterações genéticas sejam as responsáveis pela progressão das células de estágio a estágio, até originar o câncer.¹⁰⁻¹³

Figura 1. Carcinogênese do adenocarcinoma tipo intestinal e difuso, e alterações genéticas e epigenéticas associadas (Adaptado de: Cesar AC, 2002)¹⁴

Conforme apresentado na Figura 1, com base em aspectos histopatológicos o CG pode ser dividido de acordo com a classificação de *Lauren* em dois padrões básicos: tipo intestinal e tipo difuso. Tumores que contém quantidades equivalentes de ambos os componentes são chamados de “mistos”.^{4, 15}

O tipo intestinal é mais comum em pacientes com idade mais avançada. São normalmente acompanhados por metaplasia intestinal e reúne os tumores com formação glandular. Geralmente apresentam manutenção da coesão celular, padrão de crescimento expansivo e células com núcleos grandes e irregulares.^{4, 16}

O tipo difuso, por sua vez, ocorre com maior frequência em pacientes jovens, podendo ser ou não hereditário.⁴ Ele abrange todas as morfologias que não formam glândulas (tubulares ou papilares), caracterizando-se pelo crescimento não coeso e difusamente disperso das células neoplásicas em meio a estroma desmoplásico. Frequentemente apresenta células tumorais com núcleos periféricos denominadas células em “anel-de-sinete”, pois devido à elevada produção de mucina os vacúolos citoplasmáticos deslocam o núcleo ao polo oposto da célula. Os tumores difusos associam-se a maior potencial metastático (preferencialmente peritoneal), clinicamente com rápida progressão tumoral e pior prognóstico. Apresentam alta frequência de invasão à serosa, invasão linfovascular e metástase linfonodal. Aqueles que não se enquadram em nenhum desses dois tipos são definidos como “indeterminado”.^{4, 17}

O tipo intestinal é predominante em áreas de alto risco, enquanto que o tipo difuso é mais comum em áreas de baixo risco. Sugere-se que os fatores ambientais têm maior influência na carcinogênese do tipo intestinal, enquanto que os fatores genéticos têm maior influência no câncer tipo difuso.³

1.2.1. Fatores ambientais e genéticos

A etiologia do câncer é considerada multifatorial, sendo determinada por fatores ambientais e genéticos. O fator ambiental é sugerido como o maior responsável pelo CG.¹¹

Nos tumores de estômago, a maior parte das mutações é do tipo esporádico, originando-se a partir de alterações genéticas somáticas “de novo” promovidas pela exposição à carcinógenos externos. As mutações “de novo”, diferentes das herdadas, são alterações que surgem num indivíduo sem que nenhum dos seus progenitores apresente a mesma alteração.^{11,}

13

Entre os fatores ambientais, a dieta aparece como importante fator de risco principalmente no adenocarcinoma do tipo intestinal. O consumo elevado de sal, defumados, frituras e a alta ingestão de carboidratos está relacionado ao risco de desenvolvimento de lesões precursoras. Em contraste, os carotenóides, as vitaminas A, C e E, o folato e o selênio presente

em frutas e vegetais parecem relacionar-se à diminuição do risco de CG. Em contrapartida, alimentos ricos em nitrito são apontados como fator de risco na carcinogênese. Acredita-se que os compostos nitrogenados e seus metabólitos estejam envolvidos na inibição da vitamina C e de outros antioxidantes que protegem o DNA, provocando a desaminação de purinas e pirimidinas.¹⁸⁻²⁰ Hábitos como o tabagismo e consumo de álcool também se destacam como fatores relevantes associados ao desenvolvimento de CG.²¹

Além destes, os agentes infecciosos são fatores ambientais reconhecidamente relacionados ao risco de CG, contribuindo com o aparecimento de 25% de todas as neoplasias. A infecção por patógenos induz mudanças morfológicas e fisiológicas dentro do ambiente gástrico, como inflamação crônica, hipocloridria e atrofia gástrica. Os mecanismos pelos quais a inflamação crônica leva a lesões pré-cancerosas incluem: indução a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, responsáveis pelo estresse oxidativo); alteração do equilíbrio entre a taxa de proliferação/apoptose; e secreção de citocinas inflamatórias – todos os quais aumentam o risco de transformação maligna^{11, 18, 19, 21}.

Entre os agentes infecciosos envolvidos no processo neoplásico estão o *H. Pylori* e o vírus *Epstein-Barr* (EBV), classificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como carcinógenos de classe I.^{4, 22}

O *H. Pylori* é uma bactéria gram-negativa em forma de bacilo presente em mais de 50% da população mundial. A maioria dos indivíduos apresenta gastrite assintomática, onde 10-15% dos pacientes infectados desenvolvem úlcera gástrica ou duodenal. Entre os pacientes já diagnosticados com CG, 60 a 80% apresentam a bactéria no estômago. A citotoxicidade associada ao gene A (CagA), presente nas denominadas cepas CagA-positivas, representa um dos fatores de virulência mais significativos relacionado ao risco de CG, uma vez que é capaz de alterar a apoptose, proliferação e mortalidade celular.²³⁻²⁵

Enquanto o *H. Pylori* participa da fase inicial de desenvolvimento tumoral, o EBV mantém sua infecção de forma estável, prevalecendo nas células tumorais em estado de latência (ausência de replicação viral) mesmo nos estágios mais avançados da neoplasia.²⁶ A infecção pelo EBV e suas implicações no CG serão discutidas com maiores detalhes em outro tópico deste trabalho.

Quanto aos fatores genéticos relacionados à carcinogênese gástrica, síndromes genéticas e mutações nos genes da linhagem germinativa podem predispor o indivíduo ao

desenvolvimento do câncer. Estima-se que apenas 4% dos casos sejam relacionados a grupos familiares.^{17, 27}

As mutações no gene E-caderina (*CDH1*) são as mais reconhecidas alterações genéticas encontradas no CG hereditário. A E-caderina é uma proteína expressa predominantemente nas células epiteliais que exerce funções de adesão celular e resistência à invasão. O câncer familiar associado à *CDH1* segue um padrão de herança autossômica dominante, sendo predominantemente observado em indivíduos jovens, com tumores do tipo difuso de *Lauren*, particularmente carcinomas com células em anel de sinete.¹⁷

1.2.2. Alterações moleculares e progressão tumoral

Diversas alterações genéticas e epigenéticas têm sido identificadas tanto em lesões pré-malignas como na própria neoplasia gástrica.²⁸

O termo “epigenética” refere-se a qualquer mudança da expressão de um gene sem que ocorra alteração estrutural na sequência de DNA. Ou seja, há a mudança da função do gene sem alterar as sequências de bases. Diferente destas, a mutação é qualquer alteração estável da cadeia de DNA, com mudanças na sequência dos nucleotídeos.²⁹

A metilação é o principal fenômeno epigenético pelo qual um gene é silenciado, ocorrendo através da adição covalente de um grupo metila (transferido de um doador S-adenosilmetionina) à citosina presente na estrutura do DNA. Os locais mais susceptíveis à metilação são os dinucleotídeos “citosina-fosfato-guanina” (CpG), bases citosina e guanina adjacentes (uma vez que somente a citosina pode sofrer metilação). A maioria desses dinucleotídeos encontram-se em regiões chamadas de ilhas CpG, que em células normais estão protegidas da adição de metila. Essas ilhas CpG são encontradas na região promotora dos genes, que são sequências regulatórias presentes na extremidade 5' do DNA localizadas antes do início do gene que será transcrito. A metilação de ilhas CpG em regiões promotoras é responsável pelo silenciamento da expressão gênica, pois interrompe a transcrição do gene.²⁹⁻

31

A hipermetilação é vista como importante mecanismo molecular potencialmente envolvido na iniciação e progressão dos processos neoplásicos, pois o acúmulo progressivo de alterações desencadeadas por estes eventos espontâneos pode dar início a anormalidades

moleculares. Entre as alterações moleculares identificadas na carcinogênese gástrica, incluem-se: ativação de oncogenes (c-MET, KRAS e HER-2), inativação de genes supressores tumorais (p53 e APC), reativação da telomerase e expressão alterada de enzimas de reparo do DNA.²⁹⁻³¹

A disfunção do sistema de reparo do DNA participa na patogênese dos tumores de estômago esporádicos, sendo responsável pelo fenótipo conhecido como instabilidade de microssatélites (MSI)^{7, 32, 33} — o qual será discutida em outro tópico deste trabalho, junto à suas implicações clínico-patológicas e prognósticas.

1.2.2.1. Ativação de oncogenes

Os proto-oncogenes são responsáveis pelo controle das funções celulares. Quando sofrem mutações ativadoras, passam a se chamar oncogenes.

A ativação dos oncogenes assume papel importante tanto nos cânceres hereditários como nos esporádicos, pois são responsáveis por aumentar a proliferação celular ao mesmo tempo em que inibem a apoptose, eventos que podem dar início ao desenvolvimento neoplásico.²⁹ Segue abaixo alguns dos principais oncogenes envolvidos na carcinogênese gástrica:

- a. **Gene HER2 (*Human epidermal growth factor receptor 2*):** codifica a glicoproteína transmembrana HER-2, que tem a função de receptor de fator de crescimento, estando envolvida na diferenciação, adesão e mobilidade celulares.^{33, 34} A amplificação do gene destaca-se também como um importante biomarcador na identificação de pacientes potencialmente responsivos à terapia anti-HER-2, baseada no uso do anticorpo monoclonal trastuzumab (Herceptin).³⁵
- b. **Gene C-MET:** codifica o receptor para o fator de crescimento dos hepatócitos (HGF). A amplificação do gene está relacionada à presença de metástases, estágio avançado e consequentemente pior prognóstico.³⁶
- c. **Gene p16:** a inativação do p16 é vista em 40 a 90% dos CGs, aparentemente com maior frequência nos tumores intestinais. O p16 é envolvido na regulação do crescimento celular normal, juntamente com ciclinas, complexo tirosina quinase, fatores de crescimento e transformação tumoral — entre eles o TGF- α , TGF- β e os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF).^{7, 37}

- d. **Gene RAS:** responsável por codificar proteína G, que se liga a guanosina trifosfato (GTP) para ativar ou inibir a proliferação celular. Quando mutado, o gene codifica uma proteína anormal que é capaz de sinalizar e estimular a proliferação celular independente da presença de GTP ligado.²⁹
- e. **Gene MYC:** atua como fator de transcrição e na expressão da telomerase. Algumas vezes apresenta translocação do cromossomo 8 para o 14, ficando posicionado próximo a um gene codificador de imunoglobulinas, o que desregula a sua função.²⁹

1.2.2.2. Inativação de genes supressores tumorais

Os genes supressores tumorais são genes que expressam produtos que regulam negativamente o ciclo celular. Entretanto, quando sofrem mutação ou metilação, deixam de exercer suas funções normais.²⁹

Os supressores tumorais são divididos em dois grupos: “*Gatekeepers*” ou genes protetores (TP53, APC), que tem a função de regular diretamente o ciclo celular; e os “*Caretakers*”, ou genes de manutenção (BRCA1, MMR), que atuam reparando danos no DNA, mantendo a integridade genômica e evitando a instabilidade genética.²⁹

Apesar dos genes de manutenção sozinhos não induzirem a formação de neoplasia (uma vez que as alterações nesses genes não conferem vantagem à célula) quando mutados eles facilitam a ocorrência de mutações nos genes *gatekeepers*, que darão início à carcinogênese.²⁹ Segue abaixo dois dos principais genes supressores tumorais envolvidos na carcinogênese gástrica:

- a. **Gene TP53:** A inativação do TP53 ocorre em mais de 60% dos CG, independentemente do tipo histológico. Destaca-se como um evento inicial na carcinogênese gástrica, uma vez que pode estar mutado em lesões benignas ou pré-cancerosas (gastrite atrófica, metaplasia intestinal e displasia).³⁸ No estado normal, o TP53 tem papel essencial na regulação da proliferação celular, sendo responsável pela interrupção do ciclo celular na fase G1 quando há qualquer alteração na sequência de DNA para que o dano seja reparado. Nos casos em que o DNA não é reparado adequadamente, a proteína TP53 ativa o processo de apoptose. Entretanto, alterações no gene fazem com que o ciclo celular prossiga mesmo após mutação, transmitindo às células descendentes e iniciando o processo neoplásico.²⁹

- b. Gene APC (*adenomatous polyposis coli*):** produz a proteína APC, responsável pela regulação da quantidade de β -catenina livre no citoplasma. Em condições normais, a β -catenina está ligada ao complexo e-caderina, inibindo a progressão do ciclo celular. Se o gene APC estiver mutado, há produção de proteína truncada (cortada), o que leva ao aumento da porção livre de β -catenina. A β -catenina é então transportada para o núcleo ativando a transcrição de genes de proliferação celular, entre eles o MYC. Mutações nesse gene provocam a polipose intestinal adenomatosa de caráter familiar ou esporádico e síndromes que envolvem câncer colorretal, como a Síndrome de *Gardner*.²⁹ No CG, mutações do gene APC são encontradas em 50% dos adenocarcinomas bem diferenciados, sendo mais frequentes nos tumores do tipo intestinal de *Lauren*.³⁶

1.2.2.3. Reativação da telomerase

Os telômeros são estruturas compostas por proteínas e DNA não codificante que formam as extremidades dos cromossomos, e são importantes na manutenção da estabilidade e integridade dos cromossomos. A atividade da telomerase não é detectada na maioria das células normais, sendo vista apenas em células proliferativas onde funciona como uma espécie de relógio mitótico.²⁹

Nas células somáticas, a cada divisão celular ocorre a diminuição progressiva dos telômeros. Já nos tecidos germinativos e nas células tumorais, a enzima telomerase é responsável pela adição da sequência telomérica TTAGGG à extremidade terminal 3' dos cromossomos para compensar as perdas que ocorrem em cada divisão celular, proporcionando à célula capacidades replicativas ilimitadas.²⁹

A atividade da telomerase é detectada na maioria dos CG, independente do tipo histológico e estadio tumoral. Telômeros mais longos são encontrados nos tumores de estômago e nas lesões pré-neoplásicas quando comparados à mucosa gástrica normal. A telomerase está presente em 23% das metaplasias de tipo intestinal e em 50% dos adenomas gástricos, sugerindo sua atuação nos estágios iniciais da carcinogênese.³⁹

1.3. Classificação molecular do câncer gástrico

Na prática clínica atual, características histológicas são usadas para determinação prognóstica e prever a sobrevida.⁴⁰ A classificação de *Lauren* é um dos sistemas de

classificação mais amplamente utilizados e que apresenta maior valor prognóstico.^{4, 15} Além desta, a OMS reconhece quatro principais padrões histológicos de CG (tubular, papilar, mucinoso e pouco coesivo).⁴ No entanto, esses parâmetros não são suficientes para prever a progressão da doença e refletir a heterogeneidade dos tumores gástricos; e tão pouco auxiliar no desenvolvimento de terapias direcionadas.

Deste modo, identificar os subtipos de CG com base em suas características moleculares tem sido um dos objetivos para buscar uma melhor definição do prognóstico e dos resultados clínicos dos pacientes com CG.⁴¹

Proposta pelo projeto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), o CG foi categorizado recentemente em quatro subtipos com base no perfil molecular: **1) Tumores com EBV positivo**, com frequente hipermetilação do DNA; **2) Tumores com “instabilidade de microssatélites” (MSI)**, caracterizados por apresentarem hipermutação, fenótipo metilador de ilhas de CpG (*CpG-island methylator phenotype, gastric - CIMP*) e silenciamento do MLH1; **3) Tumores “genomicamente estáveis” (GS)**, que apresentam histologia difusa, mutações no CDH1 e RhoA; **4) Tumores com “instabilidade cromossômica” (CIN)**, os quais têm como características histologia intestinal, mutação do p53, aneuploidia e amplificação de receptores de tirosina quinase.⁷

Além de definir subgrupos biologicamente mais homogêneos, a categorização do CG através do reconhecimento das alterações moleculares apresenta potencial prognóstico e implicações terapêuticas, uma vez que através dela é possível identificar vias envolvidas na proliferação e sobrevivência celular, destacando biomarcadores para cada um dos subtipos moleculares como possíveis alvos terapêuticos.^{8, 42}

Atualmente, a expressão de PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) nas células tumorais foi validada como marcador preditivo de resposta à terapia com anticorpos anti-PD-1 e anti-PD-L1 em diferentes tipos de tumores, incluindo o CG. De acordo com o estudo do TCGA e ensaios clínicos recentes, os tumores EBV-positivo e com MSI correspondem aos grupos que podem se beneficiar da imunoterapia com anti-PD-1/PD-L1. Entretanto, a frequência e o valor prognóstico da expressão de PD-L1 nos tumores de estômago permanece pouco esclarecida.^{7, 43, 44}

Mediante o exposto, embora a classificação molecular por meio de tecnologias genômicas de alto-rendimento tenha expandido significativamente nossa visão sobre a natureza complexa do CG e possa melhorar a gestão da doença, a determinação desses subtipos não alcançou ainda utilidade clínica. O custo elevado e a complexidade técnica

exigida para a realização de uma classificação molecular completa continua sendo um obstáculo significativo à sua aplicação prática.

1.4. Virus *Epstein-Barr*

Descoberto em 1964, o EBV é um gama-herpes vírus (família *Herpesviridae*, subfamília *Gamaherpesvirinae*) com atividade oncogênica constituído por uma molécula linear de DNA dupla fita, envolto por um capsídeo formado por 162 capsômeros revestidos por envelope glicoproteico. O genoma do EBV é capaz de codificar aproximadamente 100 proteínas virais, responsáveis pela regulação da expressão dos genes virais, replicação do DNA viral e na modulação da resposta imune do hospedeiro.^{45, 46}

1.4.1. Via de infecção: ciclo lítico e latente

A infecção pelo EBV ocorre geralmente por via oral, sendo assintomática na maioria dos casos e persistindo na forma latente durante toda a vida do indivíduo. Estima-se que o vírus infecte mais de 90% da população mundial.^{45, 46}

O EBV invade inicialmente as células epiteliais da orofaringe, nasofaringe e glândulas salivares, onde frequentemente ocorre a replicação e produção de proteínas virais (incluindo as glicoproteínas gp350 e gp110). Nessa fase, conhecida como ciclo lítico, viriões são produzidos por gemação a partir da célula infectada. Posteriormente, o EBV se dissemina para os Linfócitos B (LB) das tonsilas, onde o genoma viral (antes linear) é transportado para o núcleo e assume a forma circular (epissoma), permanecendo em estado latente sob a forma de DNA epissomal extracromossômico. Deste modo, a infecção persiste ao longo da vida nos LB de memória, onde o EBV estabelece latência limitando a síntese de proteínas virais. Na fase de latência não há a produção de viriões e o genoma viral que reside é copiado pela DNA polimerase celular.⁴⁷⁻⁴⁹

O vírus latente expressa seus genes em um dos três padrões conhecidos como “programas de latência”. Os produtos desses genes incluem seis antígenos nucleares do EBV (EBNAs 1, 2, 3A, 3B e 3C e EBNA-LP), três proteínas latentes de membrana (LMP-1, LMP-

2A e LMP-2B), duas pequenas moléculas de RNA (EBER-1 e 2) e transcritos da região *BamHI-A* do genoma viral (BARF0 e de BARF1).^{47, 48, 50}

Cada programa de latência é caracterizado pela produção de um conjunto limitado e distinto de proteínas e RNA virais, com propriedades oncogênicas específicas (Tabela 1).

Tabela 1. Programas de latência do EBV e propriedades oncogênicas dos produtos virais expressos.

Produto expresso	Latências			Propriedades oncogênicas
	I	II	III	
EBERs 1/2	+	+	+	Evasão da resposta imune; proliferação celular
EBNA-1	+	+	+	Evasão da resposta imune; proliferação celular; indução de instabilidade genômica e mutação; resistência à morte celular
EBNA-2, 3A, 3B, 3C	-	-	+	Imortalização de células B; progressão do ciclo celular
EBNA-LP	-	+	+	Imortalização de células B; progressão do ciclo celular
LMP-1	-	+	+	Proliferação celular; indução de instabilidade genômica e mutação; resistência à morte celular; desregulação mecanismo energético celular; escape de supressores de crescimento; potencial replicativo ilimitado; promover inflamação tumoral; estimular invasão e metástase
LMP-2A, 2B	±	+	+	Proliferação celular; estimular invasão e metástase
BARTs / BART miRNAs	+	+	+	Estimular invasão e metástase; escape de supressores de crescimento; evasão da resposta imune; resistência à morte celular

EBNA, antígeno nuclear do vírus *Epstein-Barr*; LMP, proteína latente de membrana; EBER, RNA codificado do vírus *Epstein-Barr*. + expressa o gene, - não expressa o gene, +/- pode ou não expressar o gene (Adaptado de: Shinozaki-Ushiku A et al., 2015⁵⁰; Tsao S-W et al., 2015⁴⁸).

Ao infectar o LB, o EBV normalmente passa da fase de latência III a latência II, e logo à latência I. Cada uma dessas etapas exerce influência no comportamento dos LB. Na latência III, o conjunto de proteínas e RNAs produzidos ativam os LB promovendo a proliferação. Posteriormente, o vírus restringe sua expressão gênica e entra em Latência II, onde um conjunto mais limitado de proteínas e RNAs passam a ser produzidos, induzindo a diferenciação do LB em LB de memória. Finalmente, o vírus restringe a expressão gênica ainda mais, entrando em Latência I.^{48, 50, 51}

1.4.2. Mecanismos de infecção pelo EBV: linfócitos e células epiteliais

A infecção nos LB e nas células epiteliais humanas pelo EBV ocorre através de diferentes mecanismos (Figura 2). No caso do LB, o vírus entra na célula por via endocítica através da ligação entre glicoproteína viral gp350/220 com o receptor CD21 (um receptor do componente C3d do sistema complemento, também chamado de receptor CR2). Quando ocorre a divisão dos LB de memória infectados de forma latente (fase em que não são produzidas proteínas virais), o EBV expressa o antígeno nuclear 1 (EBNA 1), o qual é essencial para fazer com que o genoma viral permaneça na célula infectada preso ao DNA como um epissomo circular. Além disso, o EBNA-1 é necessário para a replicação viral e desempenha um papel central na manutenção da infecção latente pelo EBV, uma vez que permite a replicação pela DNA polimerase celular e é um fator regulador na transcrição dos genes latentes.^{48, 49}

Já o mecanismo pelo qual o EBV infecta as células epiteliais ainda não está totalmente esclarecido. Uma vez que as células epiteliais, diferente dos LB, não apresentam os receptores CD21. Três mecanismos têm sido propostos: primeiro, o EBV revestido pela imunoglobulina A (IgA) específicas para gp350/220 é capaz de se ligar especificamente ao receptor de IgA polimérico. Tais receptores de IgA são comumente expressos na saliva humana e ligam-se a proteínas denominadas componente secretora (SC), que são proteínas transmembrana expressas na superfície basolateral das células epiteliais. Deste modo, o complexo EBV/IgA/SC é internalizado pela célula epitelial via endocítica.^{47, 50} Uma segunda hipótese propõe que o receptor específico para a proteína viral gH/gL nas células epiteliais promoveria a ligação do EBV, e a interação direta entre gH/gL e as integrinas celulares $\alpha V\beta 6$ e $\alpha V\beta 8$ (que são proteínas de adesão presentes na membrana celular) possibilitaria a fusão entre o EBV e a membrana plasmática de células epiteliais.⁵² Por último, acredita-se que a interação entre o BMRF2 – uma proteína de membrana codificada por EBV – e as integrinas $\alpha 5\beta 1$ nas células epiteliais polarizadas possibilitaria a ligação do EBV à superfície celular. Uma vez que o vírus entra na célula, o capsídeo viral é eliminado no citoplasma e o genoma viral é transportado ao núcleo da célula.⁵³

Figura 2. Transmissão de EBV mediada por contato célula a célula para células epiteliais. (Adaptado de: Akiba S, 2008⁵¹; Iizasa H, 2012⁴⁷).

1.4.3. EBV no câncer gástrico

O EBV está implicado na etiologia de várias desordens linfoproliferativas, como a mononucleose infecciosa; e alguns tipos de linfoma e neoplasias epiteliais, como o carcinoma de nasofaringe indiferenciado.⁴⁸ No CG, o EBV tem sido aceito principalmente como agente infeccioso causador do carcinoma gástrico com estroma linfóide (*gastric carcinoma with lymphoid stroma* - GCLS) segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) – também conhecido como carcinoma medular ou carcinoma do tipo “*linfoepitelioma-like*” (“*lymphoepithelioma-like gastric carcinoma*”- LELGC) – que compreende cerca de 1-4% de todos os casos de CG. O GCLS é um tipo especial de CG caracterizado por apresentar proeminente infiltração linfocítica. A infecção pelo EBV está presente em cerca de 80% desses casos e em cerca de 9% dos demais adenocarcinomas.^{7, 54, 55}

A indicação de que o EBV esteja relacionado ao processo oncogênico no estômago é baseada no percentual significativo de associação com esses tumores, bem como na presença

do vírus em quase todas as células tumorais dos carcinomas gástricos EBV-positivos e o caráter monoclonal dessas células. Os carcinomas gástricos EBV-positivos, também chamados de carcinomas gástricos associados ao EBV (EBVaGC), apresentam latência do Tipo I, onde ocorre o crescimento monoclonal das células epiteliais infectadas que expressam vários genes EBV-latentes.^{47, 50}

Como descrito anteriormente, a entrada do EBV no LB ocorre por meio da ligação da proteína gp350 ao receptor CD21. O CD21, entretanto, não é expresso no epitélio gástrico. Deste modo, acredita-se que a infecção do vírus na célula epitelial gástrica ocorra principalmente através de contato célula-a-célula entre linfócitos infectados e a célula gástrica. O envolvimento do EBV na carcinogênese gástrica é evidenciado pela presença da molécula de RNA viral EBER nas células tumorais, mas não nas células epiteliais normais, e pela detecção de episômas de EBV monoclonais.^{45, 47, 50}

A gastrite crônica no contexto dos EBVaGC pode também aumentar a chance de interação entre células epiteliais gástricas e os LB, onde as citocinas produzidas por células inflamatórias podem dar suporte ao crescimento de células epiteliais gástricas infectadas com EBV.⁵⁰

Apesar do importante papel do EBV no desenvolvimento tumoral, a proteína de membrana LPM-1 – uma importante proteína do vírus – é raramente expressa no CG. O EBER, por sua vez, é expresso em quase todas as células dos EBVaGC, evidenciando sua importância para o desenvolvimento e estabelecimento da neoplasia.^{55, 56 83,85}

As proteínas dos genes latentes do EBV podem atuar em mecanismos de proliferação e morte celular, levando a formação do tumor. Foi demonstrado que o EBER pode desempenhar importante papel na carcinogênese favorecendo o aumento da expressão do oncogene MYC, cuja hiperexpressão está associada a mais de 50% dos cânceres e relacionada à pior prognóstico. O MYC pode contribuir na formação da neoplasia através da indução de instabilidade genômica, proliferação, angiogênese e crescimento celular descontrolado. A ocorrência de metilação de genes supressores tumorais induzidos pelo EBV também se destaca como um dos mecanismos virais envolvidos no processo de carcinogênese.^{7, 22, 57, 58}

O ensaio de hibridização *in situ* (*in situ hybridization* – ISH) utilizando sondas complementares ao EBER1 é considerado padrão-ouro para a detecção do EBV, permitindo a identificação das células infectadas pelo vírus. Os EBERs são os transcritos virais mais abundantes encontrados em células latentes infectadas pelo EBV, estando associado a

processos de proliferação celular, resistência à apoptose, produção de fatores de crescimento e interação com proteínas do hospedeiro para aumentar a sinalização celular.^{50, 59}

No EBVaGC, geralmente todas as células tumorais apresentam positividade nuclear para EBER-ISH. Embora bastante rara, a infecção por EBV já foi também descrita em pequenas porções da mucosa gástrica não-neoplásica em uma única célula ou em algumas glândulas, sugerindo que a infecção por EBV precede o crescimento clonal e o desenvolvimento do carcinoma.^{26, 60}

1.4.4. Características clínicas e patológicas do câncer gástrico EBV-positivo

O CG EBV-positivo apresenta algumas características clínico-patológicas particulares (Figura 3; Tabela 2). Ocorre com maior frequência em homens (2:1), pacientes em idade menos avançada e os tumores geralmente acometem a porção proximal do estômago e coto gástrico, onde a frequência de tumores EBV-positivo em pacientes submetidos à degastrectomia varia de 6 a 30%. Esses achados sugerem que danos repetitivos à mucosa gástrica, como refluxo biliar e alterações no microambiente, podem estar envolvidos no desenvolvimento de CGaEBV no estômago remanescente.^{50, 55, 61, 62}

Entre as principais características geralmente relacionadas ao CGaEBV, temos a baixa incidência de metástases linfonodal, menor invasão tumoral e invasão linfática, com sobrevida relativamente superior em comparação aos casos de CG EBV-negativo.⁵⁰ Entretanto, essa associação ainda é controversa, onde alguns apontam não haver correlação entre a infecção por EBV e os estádios pT e pN.⁵⁹

Macroscopicamente, os EBVaGC são tumores ulcerados ou ulcerados de bordas elevadas (*Borrmann* II ou III). Nos estágios iniciais, tendem a formar lesões nodulares bem delimitadas na submucosa, com menos fibrose quando comparado aos casos EBV-negativo, podendo ser bons candidatos à ressecção endoscópica.^{55, 63} Histologicamente, dividem-se geralmente em dois tipos: carcinoma gástrico com estroma linfóide (GCLS) e adenocarcinoma de tipo convencional.

O tipo GCLS é descrito como um carcinoma pouco diferenciado com infiltrado de linfócitos denso e difuso (a quantidade de infiltrado é maior do que a de tumor). Devido à proeminente infiltração linfocítica, muitas vezes torna-se difícil identificar as células tumorais em meio ao infiltrado apenas com a coloração de hematoxilina e eosina (HE). Através da coloração imuno-histoquímica (IHQ) com anticorpos para citoqueratina (CK) ou pela técnica

de EBER-ISH é possível diferenciar as células neoplásicas do infiltrado inflamatório, uma vez que as células tumorais são positivas para CK e para EBER. Importante ressaltar que todas as células de carcinoma nos EBVaGC são EBV-positivo, que suporta um papel causal com relação ao EBV na carcinogênese gástrica.^{50, 54, 55}

Figura 3. Características morfológicas típicas do CG EBV-positivo. (a) CG do tipo GCLS, mostrando células tumorais em meio a intenso infiltrado inflamatório (HE); (b) IHQ para CK AE1/AE3, apresentando as células tumorais positivas para citoqueratina; (c) reação ISH positiva para EBV; (d) IHQ positiva para expressão de MLH1; (e) área tumoral com diferenciação tubular (HE); (f) reação de ISH positiva para EBV na região de adenocarcinoma tubular (Fonte: Ramos MFKP et al., 2017⁵⁵).

Já os EBVaGC do tipo convencional são tumores moderadamente diferenciado, com padrão cribriforme, classificados como tipo intestinal de *Lauren*, com quantidades variáveis de linfócitos infiltrantes. Morfologicamente é quase idêntico ao carcinoma gástrico EBV-negativo, fazendo com que a EBER-ISH seja também recomendada para identificar a presença de EBV nas células tumorais e confirmar o diagnóstico.^{50, 64}

Com relação à imunofenotipagem, metade dos EBVaGC apresentam expressão de mucina do tipo gástrico (MUC5AC e MUC6), e não intestinal. O restante dos casos geralmente são negativo tanto para mucinas do tipo gástrico quanto para o tipo intestinal.⁵⁰

Algumas características relacionadas ao perfil de expressão também são marcantes no CG EBV-positivo. Mais de 80% dos casos expressam a molécula de adesão celular Claudina 18 (CLDN18) e, em comparação a outros tipos de CG, são tumores que exibem alta expressão de JAK2, CD274 (codifica o PD-L1) e PDCD1LG2 (codifica o PD-L2).^{7, 50}

Alguns mediadores pró-inflamatórios também estão geralmente hiperexpressos no EBVaGC, incluindo as interleucinas 6 e 1 (IL-6; IL-1) e principalmente interferon-gama (IFN- γ), pertencente a via IL-2-STAT4. Sugere-se que as quimiocinas secretadas no CG EBV-positivo promova o aumento do recrutamento de células inflamatórias no sítio da lesão, criando um microambiente favorável para resposta imune antitumoral e contribuindo para os melhores resultados desses pacientes.^{7, 56, 65}

Por este motivo, a presença de infiltrado inflamatório proeminente no tumor é reconhecidamente a principal característica do EBVaGC. As células do infiltrado tumoral são primariamente linfocíticas, particularmente LT CD8-positivos ou CD4-positivos, acompanhados por histiócitos CD68-positivos. A infiltração de LB, células plasmáticas ou neutrófilos também é observada com frequência, podendo vir acompanhada da presença de células gigantes.^{50, 54, 55}

Tal diversidade de células inflamatórias no infiltrado é uma característica importante no EBVaGC e também compartilhada por outras doenças malignas relacionadas ao EBV, tais como o linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B EBV-positivo, que são geralmente acompanhados por numerosas células inflamatórias reativas. Esta característica reflete a imunogenicidade do EBV e reforça a hipótese de que a resposta imune do hospedeiro é uma das razões para o melhor prognóstico observado nesses tumores.^{50, 61, 66}

Tabela 2. Resumo das principais características clínico-patológicas do câncer gástrico EBV-positivo.

Variáveis	Características
Incidência	<ul style="list-style-type: none"> • ~10% dos carcinomas gástricos • ~80% dos carcinomas gástrico com estroma linfóide
Idade	<ul style="list-style-type: none"> • Idade menos avançada
Gênero	<ul style="list-style-type: none"> • Mais frequente em homens (2:1)
Localização	<ul style="list-style-type: none"> • Estômago proximal: cárdia e fundo gástrico • Estômago remanescente: após gastrectomia parcial
Aspectos macroscópicos	<ul style="list-style-type: none"> • Acentuado espessamento da parede gástrica • Margem tumoral bem definida • Lesões Borrmann II • Presença de lesão sincrônica
Aspectos microscópicos	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma gástrico com estroma linfóide • Adenocarcinoma de tipo convencional • Padrão de crescimento sincicial com pouca formação glandular • Infiltrado inflamatório proeminente: Linfócitos, células plasmáticas, histiócitos, neutrófilos. • Carcinoma pouco diferenciado • Gastrite cística profunda
Fenótipo	<ul style="list-style-type: none"> • Padrão de expressão de mucinas: tipo gástrica / nenhuma
Aspectos moleculares	<ul style="list-style-type: none"> • Intensa hipermetilação do DNA, mas raramente do gene MLH-1 • Aumento da expressão e amplificação dos genes CD274 e PDCD1LG2 (PD-L1 e PD-L2); hiperexpressão de IFN- γ
Comportamento	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa incidência de metástases linfonodais • Melhor prognóstico

1.4.5. Alterações genéticas e epigenéticas induzidas pelo EBV

As proteínas expressas pelos genes virais, como descritas anteriormente, são capazes de induzir uma série de alterações genéticas e epigenéticas que podem desencadear mutações em genes relacionados ao ciclo celular, podendo levar a aceleração da proliferação celular e contribuir para o desenvolvimento neoplásico.⁴⁸

Anormalidades epigenéticas como a hipermetilação das ilhas de CpG em regiões promotoras de muitos genes relacionados ao desenvolvimento neoplásico (particularmente genes supressores tumorais) são mais prevalentes no EBVaGC do que em qualquer outro tipo de CG.^{7, 48} Tal evento resulta no silenciamento do gene e inibição da transcrição, o que pode

dar origem à neoplasia. A metilação de gene CDKN2A (p16) é relatada como a mais frequente nos tumores EBV-positivos. Entretanto, a metilação dos genes MMR como o MLH1 — frequente nos carcinomas EBV-negativos — geralmente não é vista nos carcinomas EBV-positivos, o que sugere que o EBVaGC apresente uma via carcinogênica exclusiva.^{7, 50}

Dos vários genes que podem apresentar hipermetilação no CG EBV-positivo, entre aqueles que são geralmente silenciados com maior frequência em comparação aos EBV-negativo temos o RCOR2, o RHOV, CLDN3, TMEM52 e o HOXA10. O gene RCOR2, por exemplo, apresenta silenciamento relacionado à metilação em 100% dos tumores EBV-positivo e em nenhum dos EBV-negativo.^{7, 56}

É importante ressaltar que a expressão dos genes latentes do EBV também é suprimida pela metilação. Isso ocorre porque o aumento da ativação da DNA metil-transferase pelo LMP-2A viral também induz a hipermetilação do próprio genoma de EBV, resultando em expressão limitada de genes latentes. A metilação de genes virais, embora possa ser um mecanismo de defesa do hospedeiro contra o DNA viral, pode também beneficiar o EBV ao permitir que ele escape da resposta imune do hospedeiro, pois ela reduz a expressão de antígenos que poderiam ser reconhecidos.⁵⁶ Além da metilação, os tumores EBV-positivo apresentam também altas taxas de mutações (Figura 4). Entre as mais frequentes destacam-se mutações nos genes PIK3CA, ARID1A, BCOR, e apenas raras mutações de TP53.^{7, 56, 66}

Figura 4. Frequência de alterações genéticas no CG EBV-positivo. Principais genes mutados (Adaptado de: Jacome AA, 2016)⁶⁷

1.5. Instabilidade de microssatélite

O DNA é uma molécula que frequentemente sofre alterações através de perdas de segmentos e mutações ocorridas durante o processo de divisão celular. Para corrigir tais alterações, algumas proteínas com função de realizar os reparos necessários para manter a integridade do DNA são produzidas a partir de genes conhecidos como “genes de reparo” (*mismatch repair genes* – MMR genes). Os genes MMR atuam de forma contínua, assegurando que cada informação genética seja corretamente copiada durante a replicação do DNA. Mutações nesses genes levam ao aumento na frequência de outras mutações.^{29, 68}

A MSI é uma forma de instabilidade genética fruto da inativação das proteínas de reparo do DNA. Vários genes relacionados com o reparo do DNA estão envolvidos na MSI, tais como: hMLH1 (*Gene Human mut-L Homologue 1*), hMSH2 (*Gene Human mut-S Homologue 2*), hMSH6 (*Gene Human mut-S Homologue 6*). Embora os genes estejam suscetíveis a mutações ao acaso, a grande maioria delas é eliminada pelo sistema de reparo. A ausência de função normal de reparo do DNA, demonstrada através da ocorrência de grande número de alterações nas sequências de microssatélites, podem levar ao desenvolvimento neoplásico acelerando o acúmulo de mutações em oncogenes e genes supressores tumorais.^{29, 68}

A MSI pode ser encontrada em tumores de pacientes com câncer colorretal hereditário não poliposo (HNPCC) e em vários outros subconjuntos de tumores esporádicos, incluindo o CG¹⁰⁸. Tendo em vista a importância no desenvolvimento de processos neoplásicos, os microssatélites são considerados marcadores fenotípicos de prognóstico e resposta terapêutica, onde a identificação de pacientes com mutação nos genes de reparo do DNA pode ter importante aplicação na prática clínica.^{29, 33, 69}

1.5.1. Instabilidade de microssatélite no câncer gástrico

O CG com fenótipo MSI, também chamados de carcinomas gástricos associados à instabilidade de microssatélite (CGaMSI), estão relacionados a defeitos envolvendo os genes MMR por mutação ou metilação de sua região promotora. O CGaMSI pode ser dividido em dois grupos de acordo com o nível de instabilidade: os de “alta-MSI” (*high-level instability*, MSI-H); e aqueles com “baixa-MSI” (*low-level instability*, MSI-L). Aqueles que não apresentam instabilidade são denominados “estáveis” (*microsatellite stable*, MSS). A MSI-H pode ser evidenciada pela perda da expressão das proteínas MMR determinada por IHQ.

Enquanto os MSI-L geralmente não apresentam alterações na expressão das proteínas visualizadas pela avaliação IHQ.^{32, 70}

Estima-se que a frequência de MSI no CG esteja entre 11,7 e 33,8%, variando conforme o grupo de pacientes estudados e a quantidade de marcadores examinados.⁶⁹ A metilação das ilhas CpG em regiões promotoras do gene MLH1 é a mais frequentemente associada aos carcinomas gástricos esporádicos que exibem fenótipos MSI-H e MSI-L.^{7, 69}

O silenciamento do MLH1 pode também ser visto nas etapas morfológicas consideradas pré-malignas, onde se relata o aumento progressivo na frequência de metilação do gene em amostras de carcinoma, adenomas e áreas de metaplasia. Esse achado na mucosa não-tumoral fortalece a proposição que a MSI seria um fenômeno precoce que ocorre de forma gradual ao longo da progressão neoplásica. Podendo, portanto, representar um fator de risco para identificação de pacientes com maiores chances de desenvolver um tumor.⁷¹ Os tumores com MSI são também caracterizados pelas altas taxas de mutação (Figura 5). A perda de função de MLH1 resultante da metilação do gene pode ocasionar mutações principalmente nos genes PIK3CA, KRAS, ERBB3, entre outros.^{7, 70}

Figura 5. Frequência de alterações genéticas no CG MSI. Principais genes mutados (Adaptado de: Jacome AA, 2016)⁶⁷

1.5.2. Características clínicas e patológicas do câncer gástrico com MSI

O CG com MSI apresenta algumas características particulares quando comparado ao CG com fenótipo MSS (Figura 6; Tabela 3). De modo geral, são mais frequentes em pacientes

com idade mais avançada, tumores de maior extensão, localização distal e configuração macroscópica *Borrmann* II. São comumente do tipo intestinal de *Lauren*, apresentando fenótipo foveolar com morfologia papilar, ou então carcinomas com infiltrado linfocitário acentuado (como o GCLS). Como principal característica, está a menor incidência de metástase linfonodal e melhor prognóstico de modo geral.^{33, 69, 72, 73}

Alguns relatos também demonstram que a frequência de MSI é significativamente maior em pacientes com mais de um foco tumoral, fenômeno esse provavelmente desencadeado pelo acúmulo de alterações genéticas vistas nos CGaMSI, que criam um ambiente propício ao desenvolvimento de outro tumor primário.³³

Figura 6. Características morfológicas típicas do CG com MSI. (a) CG do tipo GCLS, apresentando intenso infiltrado inflamatório entre as células tumorais; (b) área tumoral com diferenciação mucinosa (HE); (c) Reação de ISH negativa para EBV; (d) Reação de ISH negativa para EBV na área mucinosa; (e) IHQ mostrando perda da expressão de MLH-1 no tumor (seta preta). Linfócitos e células estromais servem como controle interno positivo (seta branca); (f) IHQ mostrando perda da expressão de MLH-1 na área mucinosa (seta preta) e coloração positiva nos linfócitos e mucosa normal (seta branca) (Fonte: Ramos MFKP et al., 2017).⁵⁵

Uma das características também associadas ao CG com MSI refere-se à presença de acentuado infiltrado linfocitário, particularmente composto por LTCD8.^{73, 74} A presença de

MSI é comumente vista nos GCLS não associados à infecção por EBV, correspondendo a cerca de 20% dos casos.^{7, 55}

Tabela 3. Resumo das principais características clínico-patológicas do carcinoma gástrico com MSI.

Variáveis	Características
Incidência	<ul style="list-style-type: none"> • ~13-44% dos carcinomas gástricos • ~20% dos carcinomas gástricos com estroma linfóide
Idade	<ul style="list-style-type: none"> • Idade mais avançada
Gênero	<ul style="list-style-type: none"> • Mais frequente em mulheres
Localização	<ul style="list-style-type: none"> • Estômago distal: antro e piloro
Aspectos macroscópicos	<ul style="list-style-type: none"> • Lesões Borrmann II • Lesões de maior diâmetro • Presença de lesão sincrônica
Aspectos microscópicos	<ul style="list-style-type: none"> • Menor capacidade de invadir a camada serosa • Tipo intestinal de <i>Lauren</i> • Carcinoma gástrico com estroma linfóide • Adenocarcinoma de tipo convencional • Infiltrado inflamatório proeminente: linfócitos, células plasmáticas, histiócitos, neutrófilos. • Carcinoma pouco diferenciado
Fenótipo	<ul style="list-style-type: none"> • Padrão de expressão de mucinas: tipo gástrica
Aspectos moleculares	<ul style="list-style-type: none"> • Hipermetilação do DNA com silenciamento epigenético principalmente do MLH1
Comportamento	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa incidência de metástases linfonodal • Melhor prognóstico

O CG com MSI é geralmente associado a melhor prognóstico,^{73, 74} embora ainda haja alguns resultados variados sobre sua relação com agressividade tumoral e sobrevida em comparação aos tumores gástricos MSS. Entretanto, a maioria dos estudos associa a presença de MSI a um comportamento menos agressivo e menor estadió pTNM, onde o risco de mortalidade pode ser até 37% menor em comparação aos CG MSS.^{33, 69}

1.6. Proteína de morte celular programada (PD-L1)

O PD-L1 (*programmed cell death ligand-1*) é uma glicoproteína transmembrana tipo I composta por 290 aminoácidos expressa pelo gene CD274, localizado no cromossomo 9. Sua expressão é geralmente vista nas células apresentadoras de antígeno (APC) do sistema imune, incluindo linfócitos e células dendríticas. O PD-L1 é o ligante da proteína de morte celular programada-1 (PD-1), que pertence à família das imunoglobulinas B7, envolvida no mecanismo de imunomodulação. O PD-1 é conhecidamente expresso nos linfócitos T, células B, monócitos e células *natural killer* (NK), assim como nos linfócitos infiltrantes nos tumores.^{75, 76}

O PD-L1 pode estar hiperexpresso na superfície das células epiteliais de diversos tumores sólidos. Sua expressão pode ser induzida a nível elevado em vários tipos de células por citocinas pró-inflamatórias, particularmente IFN- γ , representando um mecanismo adaptativo de resistência imunitária exercida pelas células tumorais em resposta à atividade antitumoral endógena.⁷⁵⁻⁷⁷

A interação do PD-1 com o seu ligante PD-L1 suprime a sinalização das vias PI3K e AKT, o que resulta na inibição da proliferação dos LT. Consequentemente, há inibição da resposta imune (*down regulation*), permitindo então que a célula tumoral escape da destruição pelo sistema imune.⁷⁸

1.6.1. PD-L1 e o câncer gástrico

Apesar do crescente interesse devido ao seu potencial como alvo terapêutico e dos benefícios na sobrevida apresentados em outros tumores, os estudos com PD-L1 no CG ainda são escassos, sendo predominantemente pesquisas com populações orientais e envolvendo um número relativamente pequeno de pacientes.⁷⁹⁻⁸¹

A expressão de PD-L1 no CG é muito variada, seja na incidência global ou mesmo no percentual de células com marcação positiva apresentada em cada caso. Na população asiática a frequência de casos positivos varia de 14 a 64%.⁸² De acordo com os resultados disponíveis para a população ocidental, a frequência de expressão do PD-L1 varia de 2 a 30,1% nas células tumorais gástricas e em 18 a 88,4% das células do sistema imune. De modo geral apresentam marcação com intensidade de fraca a moderada.^{82, 83}

1.6.2. Características clínico-patológicas e prognósticas do câncer gástrico PD-L1-positivo

Com relação às características clínico-patológicas, a expressão de PD-L1 no CG é vista com maior frequência em homens, pacientes com idade mais avançada e tumores de localização proximal. Histologicamente, são predominantemente expressos em tumores com padrão sólido ou histologia papilar e do tipo indeterminado de *Lauren*, sendo também associados à presença de acentuado infiltrado inflamatório. Alguns autores o correlacionam com maior profundidade de invasão tumoral e estadios mais avançados.^{7, 82, 84}

A expressão de PD-L1 é também associada a maior expressão de HER-2 e mutações no gene *PIKCA*. Além disso, sua expressão é acentuada especialmente no CG EBV-positivo e tumores com MSI.^{7, 84, 85}

Uma das características marcantes descritas no CG com expressão de PD-L1 é o aumento da expressão de FOXP3. O FOXP3 é um fator de transcrição marcador de LT regulatórios (conhecidos como *Tregs*), os quais tem a capacidade de suprimir a resposta imune inibindo a atividade dos LT citotóxicos.⁸⁶

Entretanto, o impacto da expressão de PD-L1 no prognóstico dos pacientes com CG permanece bastante controverso, onde há trabalhos que defendem seu papel como um biomarcador de pior prognóstico,⁸⁴ melhor prognóstico^{83,87} além de outros que mostram a ausência de relação com a sobrevida.⁴²

Essa variabilidade pode ser atribuída a vários fatores, tais como diferenças nas populações de estudo e principalmente a ausência de uma padronização nos métodos de avaliação, além do padrão de expressão avaliado (expressão tumoral/células do infiltrado) que pode contribuir com resultados prognósticos diferentes.^{42, 83}

1.7. Perspectivas terapêuticas: EBV, MSI e PD-L1

Estudos clínicos recentes que avaliam a imunoterapia com anticorpos anti-PD-1/PD-L1 mostram taxas de resposta superiores aos tratamentos convencionais e aumento significativo da sobrevivência de pacientes com câncer de pulmão, rim e melanoma avançado.⁷⁸

A terapia alvo para tumores PD-1/PD-L1 positivos utiliza inibidores para as moléculas de modo a permitir que resposta imune antitumoral atue. No CG, ensaios clínicos usando os anticorpos terapêuticos mostraram perspectivas promissoras. Entretanto, como uma parcela dos pacientes ainda que PD-L1 positivos não respondem ao tratamento, esforços têm se

concentrado em determinar quais possíveis biomarcadores estariam associados à maior sensibilidade ao tratamento e qual subclasse de tumores gástricos seria capaz de responder melhor à terapia direcionada.^{43, 44, 88}

Nesse sentido, o estudo do TCGA revelou algumas características do CG que pode auxiliar na identificação de tumores com potencial de resposta. A expressão de PD-L1 pelo tumor e pelas células do sistema imune presentes no infiltrado tumoral é um fenômeno marcante nos tumores EBV-positivos; e está presente também com maior frequência nos tumores com MSI do que naqueles MSS. Isso pode ser explicado porque nestes dois subtipos de CG observa-se a expressão acentuada do mediador inflamatório IFN- γ , caracterizando a resposta imune adaptativa interferon-mediada. A liberação do IFN- γ pelas células T do infiltrado tumoral induz diretamente a expressão do PD-L1 nas células tumorais e nas células imunes. Além disso, a expressão de IFN- γ é pouco frequente nos tumores genomicamente estáveis (*genomically stable*, GS) e nos tumores com instabilidade cromossômica (*chromosomal instable*, CIN) e, conseqüentemente, a expressão de PD-L1 ocorre em poucos casos nesses tumores.^{7, 42, 82, 88-90}

O CG EBV-positivo apresenta além do IFN- γ outras características que contribuem para que seja apontado como bom candidato à terapia direcionada. Os genes que codificam o PD-L1 (CD274), como anteriormente mencionado, geralmente estão amplificados nesses tumores. Além disso, as proteínas virais do EBV induzem a expressão de AP-1 e a sinalização das vias JAK/STAT, o que resulta também no aumento da expressão de PD-L1.^{7, 88, 91}

Vale ressaltar que a expressão de PD-L1 é também associada à presença de intenso infiltrado inflamatório, característica essa predominante no CG EBV-positivo e igualmente vista no CG MSI, o que reforça a suposição de que os dois subtipos sejam bons candidatos à terapia alvo específica para PD-L1. Resultados recentes mostram que 52 a 90% dos CG EBV-positivo expressam PD-L1 nas células tumorais; e 70 a 80% nas células do infiltrado. Nos CG com MSI, descreve-se a frequência de positividade para PD-L1 nas células tumorais e nas células de infiltrado de 70 - 72% e 44,4 - 96%, respectivamente.^{42, 83}

O bloqueio da ligação entre o PD-1 e PD-L1/L2, por sua vez, poderia aumentar a resposta imune antitumoral, onde se acredita que a imunoterapia pode ser uma alternativa eficaz nestes pacientes.^{7, 44, 79}

Dois anticorpos monoclonais anti-PD-1/PD-L1 — nivolumab (BMS-936558) e pembrolizumab (MK-3475) — estão atualmente aprovados para uso clínico. Como forma de potencializar a resposta, ensaios com terapia combinadas do anti PD-1/PD-L1 com outros fármacos específicos estão também em avaliação. De acordo com o estudo TCGA, os doentes

com CG EBV-positivo podem se beneficiar do uso de anticorpos anti-PD-L1 e inibidores de fosfoinositida 3-quinase (PI3K).^{7, 92}

Atualmente, ensaios clínicos com o anticorpo monoclonal PD-1 pembrolizumab estão ainda sendo realizados em pacientes com CG avançado. Do mesmo modo, aguardam-se os resultados da eficácia da monoterapia como Nivolumab e da terapia combinada com ipilimumab no CG.^{43, 93, 94}

Portanto, a presença de infecção por EBV e o status MSI/MSS — uma vez relacionados a expressão de PD-L1 e a presença de acentuado infiltrado linfocitário — têm sido propostos como marcadores preditivos para uso da terapia com anticorpos anti-PD-1/PD-L1, e o impacto dessas características na eficácia do tratamento crescente alvo de estudos.^{42, 82, 88 10,65}.

Uma vez que diferenças com relação à etnia (oriental vs. ocidental) e estágio da doença (precoce vs. avançado) contribuem para os resultados observados nos estudos,^{95, 96} conhecer as características clínico-patológicas e as implicações prognósticas relacionadas a esses grupos de pacientes em nossa população é fundamental para determinar quais fatores contribuem para a progressão da doença. Esclarecer se a adição desta nova estratégia de classificação molecular ao atual sistema de classificação do CG pode ser uma opção promissora é essencial no contexto atual, particularmente a estratificação por status de EBV e MSI, visto que sua implementação diagnóstica não requer complexidade técnica, podendo ser facilmente incorporada à prática clínica de modo a auxiliar na indicação terapêutica, determinação prognóstica e gestão da doença.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Avaliar a prevalência do vírus *Epstein-Barr* (EBV) e a imunoexpressão das enzimas de reparo do DNA (proteínas MMR – MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) e de PD-L1 em pacientes submetidos a tratamento cirúrgico potencialmente curativo por adenocarcinoma gástrico no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP).

2.2. Objetivos Secundários

- a) Verificar a associação da infecção pelo EBV, status MSI e imunoexpressão de PD-L1 com características clínico-patológicas
- b) Avaliar a associação das variáveis IHQ estudadas (EBV, MSI e PD-L1) com a sobrevida dos pacientes com CG: sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Pacientes e amostras

Para o presente estudo foram incluídos os pacientes submetidos à ressecção cirúrgica por adenocarcinoma gástrico no período de março de 2009 a fevereiro de 2016 pelo Serviço de Cirurgia Oncológica do Aparelho Digestivo do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, ICESP-HCFMUSP. Os casos foram selecionados por satisfazerem os critérios de inclusão conforme abaixo relacionados.

3.1.1. Critérios de Inclusão

- a) Ausência de evidências clínicas, de imagem ou cirúrgicas de doença metastática à distância por ocasião do diagnóstico (M0)
- b) Confirmação diagnóstica de adenocarcinoma gástrico.
- c) Cirurgia potencialmente curativa padrão: gastrectomia total ou subtotal com linfadenectomia D2.
- d) Disponibilidade de blocos de parafina representativos da neoplasia nos arquivos da Divisão de Anatomia Patológica do ICESP.

3.1.2. Considerações cirúrgicas e avaliação de seguimento

Todos pacientes foram avaliados no pós-operatório de maneira trimestral no primeiro ano e semestral nos anos seguintes. Realizaram-se exames de seguimento para detecção de recidivas baseados na presença de sintomas. Considerou-se perda de seguimento quando não houve comparecimento em consultas por mais de 12 meses.

Todos os casos do presente estudo foram operados por cirurgiões especialistas no tratamento cirúrgico do CG, com ampla experiência. A técnica cirúrgica, extensão de ressecção e cadeias linfonodais dissecadas seguiram as recomendações da *Japanese Gastric Cancer Association* (JGCA) ⁹⁷ e definidas com base no julgamento do cirurgião responsável pelo caso.

3.2. Desenho do estudo

Cronologia:

- a) Consulta em banco de dados coletados prospectivamente da Cirurgia do Aparelho Digestivo (estômago) para identificação dos pacientes submetidos a procedimento cirúrgico entre 2009 e 2016.
- b) Seleção dos casos com CG submetidos à ressecção cirúrgica da lesão primária com linfadenectomia D2.
- c) Seleção dos blocos adequados para confecção do TMA ("*Tissue Microarray*") e lâminas para reações de imuno-histoquímica (IHQ) e hibridização *in situ* (ISH)
- d) Avaliação microscópica das lâminas de TMA
- e) Análise dos resultados.

3.3. Considerações Éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o número de registro NP 771/15 (Anexo A) A aprovação na Plataforma Brasil foi obtida em 8 de abril de 2015, sob o CAAE 43453515.6.0000.0065.

Os dados clínicos dos pacientes foram coletados através de registros em prontuário eletrônico armazenados em banco de dados médico do grupo do estômago conforme projeto de pesquisa aprovado pelo CEP sob o número de registro NP 993/2016 (Anexo B) e na Plataforma Brasil sob o registro CAAE: 62915516.2.0000.0065

3.4. Variáveis clínico-patológicas

Selecionaram-se as seguintes variáveis com os respectivos critérios de avaliação para compor o estudo:

- a) **Idade:** determinada em anos, da data de nascimento à data da cirurgia.
- b) **Sexo:** qualitativamente determinado como masculino ou feminino.
- c) **Índice de massa corpórea (IMC):** avaliado numericamente através de peso (Kg) e altura (cm) obtidos na consulta pré-operatória por meio da fórmula: $IMC (Kg/m^2) = \text{peso}/(\text{altura})^2$

- d) **Razão neutrófilo/linfócito (NLR):** quantidade de linfócitos (mil/mm³) e neutrófilos (mil/mm³) obtidos por meio de exames laboratoriais no pré-operatório e determinados pela divisão do número de neutrófilos pelo número de linfócitos.
- e) **Presença de comorbidades:** Determinada pelo cirurgião responsável através da classificação de Charlson (1987).⁹⁸ A partir dos 40 anos de idade foi acrescentado 1 ponto para cada década de vida. Valores de Charlson maiores ou iguais a 5 foram considerados como alto.
- f) **ASA (*American Society of Anesthesiologists*):** Classificação de ASA⁹⁹ foi realizada pela equipe de anestesiologia e determinada como I - Paciente saudável; II - Doença sistêmica moderada, sem limitação das funções vitais; III - Doença sistêmica severa, com funções vitais comprometidas; IV - Doença sistêmica severa com ameaça à vida. Para análise foram categorizadas dicotomicamente em I/II e III/IV.
- g) **Presença de terapia neoadjuvante e/ou adjuvante:** determinado como presente ou ausente.
- h) **Localização do tumor:** classificada em proximal (cárdia e fundo), medial (corpo), distal (antro e incisura angular) ou total (acometimento difuso), de acordo com localização descrita em laudo anatomopatológico.
- i) **Extensão de ressecção:** classificada como total ou subtotal, conforme extensão da ressecção gástrica determinada com base na localização do tumor para a obtenção de margens livres. A técnica cirúrgica, extensão de ressecção e cadeias linfonodais dissecadas seguiram as recomendações da JGCA.⁹⁷
- j) **Configuração macroscópica:** determinado conforme a classificação de *Borrmann* descrita em exame macroscópico; ou de acordo com JGCA para os tumores precoces.⁴ Foram divididos em cinco categorias (I: vegetante ou polipoide; II: ulcerado de bordas elevadas; III: ulcero-infiltrativo; IV: infiltrativo, linite plástica; V: indeterminado). Para análise, foram agrupados de modo simplificado em I/II e III/IV (os indeterminados não foram incluídos na avaliação).
- k) **Tamanho do tumor:** determinado em centímetros, a partir da avaliação feita durante o exame macroscópico do espécime cirúrgico e descrita em laudo anatomopatológico.
- l) **Tipo histológico de *Lauren*:** determinado como intestinal, difuso, misto ou indeterminado (não classificável). Analisados individualmente e agrupados para análise em intestinal/indeterminado e difuso/misto.

- m) **Grau de diferenciação histológico:** classificados como bem diferenciado (G1), moderadamente diferenciados (G2) e pouco diferenciados (G3). Agrupados para análise em bem/moderadamente diferenciados (G1/G2) e pouco diferenciados (G3).
- n) **Invasão tumoral:** determinada de modo simplificado em pT1 (incluindo pT1a e pT1b), pT2, pT3 e pT4 (incluindo pT4a e pT4b) de acordo com a invasão do tumor na parede gástrica.
- o) **Número de linfonodos dissecados:** determinado através do número total de linfonodos avaliados ao exame histológico, independente da cadeia que foi dissecada.
- p) **Presença de metástase linfonodal:** qualitativamente determinada como presente ou ausente, independente da quantidade de linfonodos acometidos.
- q) **Invasão linfática, venosa e perineural:** qualitativamente determinada como presente ou ausente, mediante a avaliação da presença de células tumorais nos espaços vasculares revestidos por endotélio (invasão linfática), nos vasos circundados por camada muscular lisa (invasão venosa), ou acometendo o perineuro ou feixe neural (invasão perineural).
- r) **Infiltrado inflamatório peritumoral:** determinado por meio de avaliação qualitativa/semi-quantitativa entre as células tumorais e peritumorais como ausente, leve, moderado e intenso. Agrupados para análise em ausente/leve e moderado/intenso.
- s) **Estadio pTNM:** determinado pelo agrupamento TNM 7ª edição (UICC/TNM 7th edition),⁶ simplificado em estágio I, II, III e IV e categorizadas dicotomicamente em I/II e III/IV.
- t) **Complicação cirúrgica:** determinadas utilizando a classificação de *Clavien-Dindo* (2004).¹⁰⁰ Complicações maiores foram consideradas Clavien III, IV e V. A mortalidade cirúrgica (Clavien V) foi considerada quando ocorrida nos primeiros 30 dias após a cirurgia ou até a alta hospitalar.

3.5. Confeção dos blocos de *tissue microarray*

O arranjo em matriz tecidual (do inglês, *tissue microarray* - TMA) constitui um método que redistribui numerosos fragmentos cilíndricos teciduais de blocos de parafina convencionais (blocos doadores) em um novo bloco (bloco receptor). Este bloco compartimentalizado contém as várias amostras teciduais seguindo ordem pré-determinada,

permitindo assim o estudo da expressão de marcadores moleculares em larga escala com grande aproveitamento do material arquivado, redução de tempo e de custos.

Para a confecção do TMA, foram selecionados os blocos mais representativos de todos os pacientes, contendo tumor e área adjacente não tumoral, provenientes do Laboratório de Anatomia Patológica do ICESP. Os cortes histológicos representativos dos casos corados por hematoxilina e eosina (HE) foram revisados e as áreas de interesse para construção dos blocos de TMA marcadas sobre as lâminas endereçando o tumor primário e mucosa não-tumoral. Cilindros de ~2 mm (ou spots) de diâmetro das áreas de interesse selecionadas nos blocos de parafina doadores foram extraídos e transportados para os blocos de parafina receptores utilizando sistema mecanizado de precisão (*Manual Tissue Microarray, Beecher Instruments, Silver Springs, MD, EUA*), com espaço de ~2 mm entre os cilindros (Figura 7). Para efeito de orientação de posição, na primeira linha horizontal e nas primeiras três posições da primeira coluna foram dispostos tecidos controles obtidos de necropsia (rim).

Figura 7. Equipamento utilizado para construção dos blocos de TMA.

A fim de minimizar as perdas de representatividade inerentes a metodologia do TMA, cada caso foi representado contendo cinco amostras, sendo três amostras correspondentes a tecido tumoral e duas amostras de mucosa gástrica não-tumoral por pacientes. Cada cilindro amostral foi alocado numa posição do bloco receptor definido através de um sistema cartesiano de coordenadas. Os blocos receptores foram confeccionados com parafina *Histosec* em pastilhas (*Merk, EUA*), no Laboratório de Patologia Hepática (LIM-14) da FMUSP (Figura 8).

Visando evitar a perda de material devido à necessidade de nivelar o bloco de parafina para a realização dos cortes histológicos, os mesmos foram submetidos à sessão única de microtomia, na qual foi obtida uma média de 50 a 70 secções de 4-5µm por bloco de TMA que foram dispostas em lâminas sinalizadas. As lâminas foram submetidas a banho de parafina e arquivadas refrigeradas (-20°C) em caixa escuras, visando à preservação da antigenicidade das mesmas até o momento do uso.

Durante a construção do bloco de TMA foi preparado o mapa em planilha Excel com a localização e identificação das amostras de tecidos, objetivando orientar a leitura posterior das reações IHQ.

Figura 8. Blocos de TMA com as amostras parafinadas de tumor e mucosa não-tumoral dos pacientes incluídos no estudo.

3.6. Técnica histológica convencional

Secções histológicas de 4 µm de espessura foram obtidas de cada bloco de TMA e submetidas a protocolo de coloração de HE de acordo com as seguintes etapas:

- a) Desparafinização em xilol a 60°C (10 min.) e xilol em temperatura ambiente (10 min.);
- b) Hidratação em álcool absoluto, álcool 95% e álcool 80%, respectivamente (três passagens);
- c) Hidratação em água corrente e água destilada;
- d) Hematoxilina de *Harris* por 3 minutos;
- e) Lavagem em água corrente e água destilada;

- f) Passagens sucessivas em álcool 50%, álcool 80% e álcool absoluto;
- g) Eosina por 2 minutos;
- h) Quatro passagens em álcool absoluto para desidratação;
- i) Diafanização em xilol (4 passagens);
- j) Montagem em *Entellan* (Merck, EUA).

3.7. Reação imuno-histoquímica

A pesquisa imuno-histoquímica (IHQ) foi realizada pelo Laboratório de Patologia (LIM-14) da FMUSP e pelo Laboratório de Anatomia Patológica do ICESP-HCFMUSP. A avaliação microscópica foi realizada por dois patologistas, sem conhecimento prévio dos dados clínicos dos pacientes contidos nas lâminas de TMA.

Os cortes histológicos de tecido a partir dos blocos de TMA para as reações de IHQ foram desparafinadas em xilol, reidratadas em diluições de etanol (100%, 95%, 80%, 70%).

Todas as reações para as MMR proteínas foram realizadas em plataforma de imunocoloração automatizada *Ventana BenchMark Ultra* seguindo-se estritamente o protocolo do fabricante, acompanhado pelo kit de detecção *OptiView DAB* (Ventana, Ref. 790-700) em conjunto com kit de amplificação *OptiView Amplification Kit* (Ventana, Ref.: 790-099), ambos prontos para uso, para aumentar a intensidade de coloração dos anticorpos primários.

Para avaliação da expressão de PD-L1, as lâminas foram submetidas à recuperação antigênica por calor induzido, usando tampão citrato (pH 9,0 para PD-L1 e pH 6,0 para MMR) em panela a vapor (*Antigen Retrieval Buffer 4*; 100x TRIS-EDTA Buffer - Spring Bioscience ref. PMB4-250), durante 30 minutos.

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por imersão em peróxido de hidrogênio a 6% (Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ), com três trocas de 10 minutos cada. Em seguida foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10mM, pH 7,4 (Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ).

Posteriormente, aplicou-se o anticorpo primário (anti-PD-L1) e as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 4°C por 16-18 horas.

Após o tempo decorrido, realizaram-se novas lavagens com PBS e as lâminas seguiram então para incubação com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (*Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System, Newcastle, Reino Unido*), por 30 minutos a

37°C, com posterior lavagem com PBS. Em seguida, procedeu-se a etapa da revelação em solução com substrato cromogênico assim preparada: 100mg de 3,3' tetrahidroclorato de diaminobenzidina (DAB) (Sigma, D- 5637, EUA), 1 ml dimetilsulfóxido (DMSO), 1 ml de H₂O₂ a 6%, 100 ml de PBS. As lâminas foram incubadas por 5 minutos, a 37°C. Em seguida, a solução DAB foi removida por lavagem com água destilada e as lâminas contra-coradas com hematoxilina.

A coloração das lâminas de IHQ com hematoxilina foi realizada conforme o protocolo descrito a seguir:

- a) Mergulhar as lâminas em solução de Hematoxilina de *Harris* por 1 minuto;
- b) Lavar em água corrente e destilada;
- c) Mergulhar por 2 vezes em solução de hidróxido de amônio 0,5%;
- d) Lavar em água corrente e destilada;
- e) Desidratar as lâminas em concentrações crescentes de etanol (50%, 80%, 95%, 100%, três passagens em sequencia de 30 segundos cada);
- f) Passar as lâminas em xilol para diafanização (quatro passagens de 30 segundos cada);
- g) Montagem das lâminas com lamínula e *Entellan* (Merck, EUA).

3.7.1. Anticorpos primários e controles

Para avaliação de instabilidade de microssatélite (MSI) utilizaram-se anticorpos primários monoclonais dirigidos contra os antígenos produtos dos genes codificadores das enzimas de reparo do DNA (MMPR): anti-MLH1 (clone M1 - Ventana, ref. 790-4535), anti-MSH2 (clone G219-1129 – Cell Marque, ref. 760-4265), anti-MSH6 (clone 44 – Ventana, ref. 790-4455), e anti-PMS2 (clone EPR 3947 – Cell Marque, ref. 760-453) – todos prontos para uso.

Espécimes de adenocarcinoma colorretal conhecido por expressar os antígenos acima foram utilizados como controle positivo. Ademais, as amostras de mucosa não-tumoral de cada paciente representados no TMA também serviram de controle, uma vez que estas exibem positividade nuclear para as enzimas MMR

A avaliação da imunexpressão do PD-L1 foi realizada com o uso do anticorpo monoclonal anti-PD-L1 (clone 28-8, 1:50), isotipo IgG de coelho (Abcam, Cambridge, MA). Como controle positivo para a reação utilizou-se tecido linfonodal reconhecido por expressar positividade para o marcador. Os controles negativos foram obtidos através da omissão do anticorpo primário.

3.7.2. Interpretação dos resultados imuno-histoquímicos

As reações IHQ para as proteínas MMR foram qualitativamente interpretadas como positivas ou negativas ou de resultado inconclusivo nas amostras dos tumores primários representados nas secções obtidas a partir dos blocos de TMA. Foi considerada perda da expressão quando não identificada deposição do produto cromógeno sobre os núcleos das células neoplásicas, sendo paralelamente observados controles teciduais positivos. Ausência de perda da expressão (expressão preservada) foi considerada quando identificada marcação nuclear nas células neoplásicas, independente da intensidade ou número de células marcadas, em reação na qual não tenha sido identificada marcação de fundo interpretada como inespecífica.

A imunorreatividade do PD-L1 na membrana e/ou citoplasmática das células tumorais e células inflamatórias foi avaliada para cada um dos spots com base na porcentagem de células coradas em relação à quantidade total de células. A expressão tecidual de cada caso, por sua vez, foi definida através do *hotspot* e a expressão tecidual do marcador categorizada dicotomicamente em negativa ou positiva. Os casos com pelo menos 2% de expressão foram considerados positivos, independente da distribuição e intensidade da coloração.

3.8. Detecção do vírus *Epstein-Barr* por hibridização *in situ*

As lâminas de TMA foram submetidas à hibridização *in situ* (ISH) para teste de infecção por EBV com uma sonda de 30 pb (probe 5'- AGA CAC CGT CCT CAC CAC CCG GGA CTT GTA - 3'), complementar ao RNA-1 (EBER1) (Y5200, DAKO, Carpinteria, USA), o produto viral mais abundante nas células durante a infecção latente. A detecção da reação foi realizada pelo método avidina-biotina peroxidase e as lâminas coradas com hematoxilina de *Harris* avaliadas por microscopia óptica convencional.

Amostras de tumor gástrico positivas para EBV foram utilizadas como controle positivo e lâminas com a omissão da sonda como controle negativo. Foram consideradas positivas as amostras onde 5% ou mais de células neoplásicas coradas foram visualizadas. Aquelas sem marcação, por sua vez, foram classificadas como negativas para infecção por EBV.

Figura 9. Lâminas de TMA coradas após reação de hibridização *in situ* (ISH) para EBV e imunohistoquímica para as proteínas MMR.

3.9. Análise Estatística

Os resultados para a infecção por EBV, expressão das MMR e expressão do PD-L1 foram correlacionados entre si, e avaliados quanto à existência de associação dos mesmos com os fatores clínico-patológicos.

Os dados foram descritos em função da média, mediana, desvio padrão ($\pm$ DP), mínima, máxima para as variáveis quantitativas e tabelas de frequência para as variáveis qualitativas.

Realizou-se a comparação entre as variáveis quantitativas através do *teste-t*. A associação entre as variáveis categóricas foi determinada por meio do teste qui-quadrado de *Pearson* ou exato de *Fisher*.

A sobrevida livre de doença (SLD) e a sobrevida global (SG) foram estimadas através do método de *Kaplan-Meier* e as diferenças na sobrevida avaliadas usando o teste de *Log-rank*.

Para determinar os fatores de risco associados com a SLD e SG, calculou-se o risco relativo (“*hazard ratios*”) com intervalos de confiança de 95% (IC95%) por meio do modelo de riscos proporcionais de Cox. As variáveis que atingiram significância na análise univariada foram incluídas no modelo multivariado para determinar quais variáveis afetaram de forma independente o prognóstico.

Para a sobrevida livre de doença (SLD) foi considerado o tempo decorrido entre a cirurgia e a data de diagnóstico da recidiva. Para SG foi considerado o tempo, em meses, entre a data da cirurgia e a data do óbito ou do último seguimento. Os óbitos cirúrgicos (definido

como morte dentro de 30 dias após a cirurgia ou até alta hospitalar) foram excluídos da análise de SLD.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico SPSS versão 20.0 (SPSS, Chicago, IL. EUA). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Descrição da amostra

Incluíram-se neste estudo 287 pacientes com CG submetidos à gastrectomia com linfadenectomia D2 com intenção potencialmente curativa.

A média de idade dos pacientes foi de 61,5 anos (variando de 26 a 87 anos), com predomínio do sexo masculino (58,5%) e razão M:F de 1,41. A maior parte dos tumores acometia a porção distal do estômago, sendo a gastrectomia subtotal realizada em 174 casos (60,6%). Terapia neoadjuvante foi administrada em 34 pacientes (11,8%). As frequências das características clínicas e cirúrgicas dos pacientes encontram-se descritos na Tabela 4.

Macroscopicamente, a maior parte das lesões eram ulcero-infiltrativas, com dimensões variando de 0,3 a 20 cm. Pela avaliação microscópica, os tumores eram predominantemente pouco diferenciados (55,7%), com invasão da camada subserosa (pT3). A média de linfonodos (LNs) dissecados por paciente foi de 41,8 e mais da metade dos pacientes apresentava metástase linfonodal (LNM) (56,4%) (Tabela 5).

Em sua maior parte, os tumores apresentaram estadiopTNM III (43,2%). A mortalidade cirúrgica (Clavien V) foi de 4,2%, e 55,1% dos pacientes foram submetidos à terapia adjuvante (Tabela 6).

Tabela 4. Características clínicas e cirúrgicas dos pacientes com câncer gástrico incluídos no estudo (n= 287).

Variáveis	n = 287	%
Idade (anos)		
Média	61,5	—
DP (min-max)	12,07 (26 - 87)	—
Sexo		
Feminino	119	41,5
Masculino	168	58,5
IMC (Kg/cm²)		
Média	24,4	—
DP (min-max)	5,4 (12,5 - 56,5)	—
Razão Neutrófilo/Linfócito (NLR)		
Média	2,55	—
DP (min-max)	2,24 (0,34 - 17,8)	—
<i>na</i>	2	0,7
Comorbidade (CCS)		
< 5	168	58,5
≥ 5	119	41,5
ASA		
I/II	256	89,2
III/IV	31	10,8
Extensão da ressecção		
Subtotal	174	60,6
Total	113	39,4
Localização do tumor		
Proximal	34	11,8
Medial	52	18,1
Distal	191	66,6
Inteiro	10	3,5

na, não avaliado

Tabela 5. Características anatomopatológicas dos pacientes com câncer gástrico incluídos no estudo (n= 287).

Variáveis	n = 287	%
Configuração Macroscópica		
I	28	9,8
II	41	14,3
III	139	48,4
IV	55	19,2
V	24	8,4
Tamanho do Tumor (cm)		
Média	4,9	—
Grau de diferenciação histológico		
G1/G2	127	44,3
G3	160	55,7
Tipo histológico de <i>Lauren</i>		
Intestinal	136	47,4
Difuso	109	38,0
Misto	29	10,1
Indeterminado	13	4,5
Invasão tumoral (pT)		
pT1	78	27,2
pT2	37	12,9
pT3	88	30,7
pT4	84	29,3
Nº de LNs dissecados		
Média	41,8	—
Metástase Linfonodal (pN)		
pN0	125	43,6
pN1	37	12,9
pN2	58	20,2
pN3	67	23,3
Infiltrado inflamatório peritumoral		
Ausente/leve	191	66,6
Moderado/intenso	96	33,4
Invasão linfática		
Ausente	141	49,1
Presente	144	50,2
na	2	0,7
Invasão venosa		
Ausente	191	66,6
Presente	94	32,8
na	2	0,7
Invasão perineural		
Ausente	146	50,9
Presente	137	47,7
na	4	1,4

na, não avaliado

Tabela 6. Características pós-operatórias dos pacientes com câncer gástrico incluídos no estudo (n= 287).

Variáveis	n = 287	%
Estadio pTNM		
I	90	31,4
II	68	23,7
III	124	43,2
IV	5	1,7
Complicação cirúrgica (Clavien-Dindo)		
Grau 0 - II	245	85,4
Grau III - IV	30	10,5
Grau V	12	4,2
Terapia adjuvante		
Não	129	44,9
Sim	158	55,1

4.2. Dados de seguimento

Num tempo médio de seguimento de 38,4 meses (mediana de 29 meses, 1-90 meses), a média de sobrevida global dos doentes incluídos nesse estudo foi de 64,3 meses (IC 95% 59,71 – 68,83; mediana não atingida). Até o momento do estudo, um total de 73 pacientes apresentou recidiva da doença (29 loco-regional e 44 à distância) e 84 pacientes foram a óbito. O seguimento mediano foi de 36 meses para os pacientes vivos (média de 38,3 meses, DP $\pm$ 20,4). A taxa de SLD e SG para toda a população foi de 73,5% e 70,7%, respectivamente.

4.3. Dados imuno-histoquímicos e expressão dos marcadores avaliados

Nos cortes histológicos realizados a partir dos blocos de TMA e nas reações de IHQ, houve perda de material (física e/ou de representatividade) para algum dos parâmetros avaliados em 67 casos, o que representou um índice de aproveitamento de 76,7% do total de casos incluídos no estudo. Após a avaliação microscópica, para a execução das análises os pacientes foram divididos em grupos de acordo com a expressão dos marcadores avaliados do seguinte modo:

- a) “EBV-positivo” e “EBV-negativo” = total de 286 pacientes.
- b) “MSI” e “MSS”, sendo o fenótipo de instabilidade de microssatélite (MSI) determinado pela perda da expressão de uma ou mais proteínas MMR e o fenótipo microssatélite estável (MSS) apenas para os casos que tiveram a expressão das 4 proteínas MMR avaliadas = total de 222 pacientes.
- c) “PD-L1 positivo” e “PD-L1 negativo”, avaliado considerando a expressão global e isoladamente para cada padrão de expressão: expressão nas células tumorais (TC) e expressão nas células imunes do infiltrado tumoral (TIIC) = total de 285 pacientes.

Os resultados dos três parâmetros avaliados e as perdas inerentes ao método (casos descritos como não-determinado, *nd*) para cada um dos marcadores podem ser vistos em detalhes na tabela 7.

Tabela 7. Resultados imuno-histoquímicos e percentuais de casos avaliados.

Variável IHQ	n=287	%
Infecção por EBV		
Positivo	30	10,5
Negativo	256	89,2
<i>nd</i>	1	0,3
Status Microsatélite		
MSS	162	56,5
MSI	60	20,9
<i>nd</i>	65	22,6
Expressão de MLH-1		
Preservada	239	83,3
Não expresso	45	15,7
<i>nd</i>	3	1,0
Expressão de MSH-2		
Preservada	231	80,5
Não expresso	2	0,7
<i>nd</i>	54	18,8
Expressão de MSH-6		
Preservada	249	86,8
Não expresso	2	0,7
<i>nd</i>	36	12,5
Expressão de PMS-2		
Preservada	217	75,6
Não expresso	50	17,4
<i>nd</i>	20	7,0
Expressão de PD-L1		
Positivo	25	8,7
— Célula Tumoral (TC)	11	3,8
— Célula imune do infiltrado tumoral (TIIC)	7	2,4
— TCs e TIICs	7	2,4
Negativo	260	90,6
<i>nd</i>	2	0,7

nd, não-determinado; MSS, fenótipo microsatélite estável; MSI, fenótipo de instabilidade de microsatélite

4.4. Avaliação da infecção por EBV

Detectou-se positividade para EBV em 30 dos 286 casos submetidos à ISH, evidenciando uma prevalência da infecção de 10,5%. Todos os casos EBV-positivo exibiram intensa marcação nuclear nos três spots avaliados. A positividade foi vista em todas as células tumorais (Figura 10 e 11). Em um dos casos em que as células tumorais foram EBV-negativo, verificou-se marcação nuclear em linfócitos infiltrados. Todas as amostras de mucosa não-tumoral foram negativas na reação de EBER-ISH.

Figura 10. Avaliação da presença de infecção por EBV no CG detectada pela técnica de hibridização *in situ* (EBER-ISH). Caso EBV-negativo (à esquerda) e caso EBV-positivo (à direita) (aumento de 7,5x).

Figura 11. CG EBV-positivo, com células tumorais exibindo intensa marcação nuclear (EBER-ISH) (aumento de 20x).

4.4.1. EBV e características clínico-patológicas

Em análise univariada, não foram observadas diferenças entre os grupos EBV-positivo e EBV-negativo com relação ao IMC ($p=0,306$), NLR ($p=0,431$) e ASA ($p=0,876$). Sete pacientes EBV-positivo e 17 pacientes EBV-negativo foram submetidos à terapia neoadjuvante ($p=0,066$).

As características clínico-patológicas dos CGs EBV-positivo e EBV-negativo são apresentadas na Tabela 8 e 9.

Sexo masculino, localização proximal, histologia pouco diferenciada, tipo histológico de *Lauren* indeterminado e presença de infiltrado peritumoral moderado/intenso foram características significativamente associadas a tumores EBV-positivo. Gastrectomia total foi realizada com maior frequência nos tumores gástricos EBV-positivo.

Não houve diferenças entre os grupos com relação a presença de comorbidades ($p=0,431$). Terapia adjuvante foi administrada em 55,1% e 53,3% dos pacientes com CG EBV-negativo e EBV-positivo, respectivamente ($p=0,856$).

Tabela 8. Características clínicas dos pacientes com câncer gástrico de acordo com a presença de infecção pelo EBV.

Variáveis	Infecção por <i>Epstein Barr</i> (EBV)		<i>p</i>
	EBV-negativo n=256 (%)	EBV-positivo n=30 (%)	
Idade (anos)			0,973
Média ($\pm$ DP)	61,5 ($\pm$ 12,2)	61,4 ($\pm$ 11,2)	
Sexo			0,032
Masculino	144 (56,2)	23 (76,7)	
Feminino	112 (43,8)	7 (23,3)	
Localização do tumor			< 0,001
Proximal	26 (10,2)	8 (26,7)	
Medial	45 (17,6)	7 (23,3)	
Distal	179 (69,9)	11 (36,7)	
Total	6 (2,3)	4 (13,3)	
Extensão de ressecção			< 0,001
Subtotal	165 (65,5)	8 (26,7)	
Total	91 (35,5)	22 (73,3)	

Tabela 9. Características anatomopatológicas dos pacientes com câncer gástrico de acordo com a presença de infecção pelo EBV.

Variáveis	Infecção por <i>Epstein Barr</i> (EBV)		<i>p</i>
	EBV-negativo n=256 (%)	EBV-positivo n=30 (%)	
Configuração Macroscópica*			0,313
I/II	60 (25,4)	9 (34,6)	
III/IV	176 (74,6)	17 (65,4)	
Tamanho do Tumor (cm)			0,075
Média (±DP)	4,7 (±3.0)	6,3 (±4.4)	
Grau de diferenciação histológico			0,043
G1/G2	118 (46,1)	8 (26,7)	
G3	138 (53,9)	22 (73,3)	
Tipo histológico de <i>Lauren</i>			< 0,001
Intestinal	125 (48,8)	11 (36,7)	
Difuso/misto	125 (48,8)	12 (40)	
Indeterminado	6 (2,3)	7 (23,3)	
Invasão tumoral (pT)			0,440
pT1/2	104 (40,6)	10 (33,3)	
pT3/4	152 (59,4)	20 (66,7)	
Nº de LNs dissecados			0,624
Média	42.0	40,3	
Metástase Linfonodal (LNM)			0,699
Ausente	110 (43)	14 (46,7)	
Presente	146 (57)	16 (53,3)	
Invasão Linfática*			0,783
Ausente	125 (49)	15 (51,7)	
Presente	130 (51)	14 (48,3)	
Invasão venosa*			0,506
Ausente	169 (66,3)	21 (72,4)	
Presente	86 (33,7)	8 (27,6)	
Invasão Perineural*			0,453
Ausente	132 (52,2)	13 (44,8)	
Presente	121 (47,8)	16 (55,2)	
Infiltrado inflamatório peritumoral			< 0,001
Ausente/leve	182 (71,1)	8 (26,7)	
Moderado/intenso	74 (28,9)	22 (73,3)	
Estadio pTNM			0,553
I/II	139 (54,3)	18 (60)	
III/IV	117(45,7)	12 (40)	

* presença de casos não avaliados

4.4.2. EBV e sobrevida

Conforme evidenciado pelas curvas de *Kaplan-Meier* (Figura 12), não houve diferenças significativas na SLD entre os grupos EBV-positivo e EBV-negativo (70% vs. 73,8%, respectivamente; $p=0,610$), nem quando ajustada para a presença de LNM (pN0: EBV-negativo= 92,1% vs. EBV-positivo= 92,9%, $p=0,886$; pN+: EBV-negativo= 60,8% vs. EBV-positivo= 50,0%, $p=0,202$).

Figura 12. Sobrevida livre de doença dos pacientes com CG EBV-positivo e EBV-negativo ($p=0,610$) — (Curva de *Kaplan-Meier* e teste de *Log-rank*).

Em relação à SG (Figura 13), não houve diferença na sobrevida entre os tumores EBV-positivo e EBV-negativo (76.7% vs. 69.9%, respectivamente; $p=0,432$). Quando ajustado por estágio, não foram observadas diferenças estatísticas para SG entre os grupos (pTNM I/II: EBV-negativo= 83,5% vs. EBV-positivo= 94,4%, $p=0,213$; pTNM III/IV: EBV-negativo= 53,8% vs. EBV-positivo= 50%, $p=0,662$).

Figura 13. Sobrevida global dos pacientes com CG EBV-positivo e EBV-negativos ($p = 0,432$) — (Curva de *Kaplan-Meier* e teste de *Log-rank*).

4.5. Análise da imunoexpressão das proteínas MMR

Após a avaliação microscópica da expressão das 4 proteínas MMR, 60 (27%) casos entre os 222 disponíveis para análise mostraram-se negativos para pelo menos uma das proteínas avaliadas (Figura 14 e 15).

Considerando o estado dos marcadores individualmente, 45 casos mostraram perda de expressão de MLH1, 2 perda de MSH2, 2 perda de MSH6 e 50 perda de PMS2.

Trinta e seis casos (16,2%) apresentaram perda simultânea da expressão de MLH-1 e PMS-2, um caso de MSH-2 e MSH-6 e um caso perda de MLH-1, MSH-6 e PMS-2. A perda isolada da expressão foi vista em 8 pacientes para MLH-1 (entretanto, destes apenas 1 caso teve resultados disponíveis para as 4 proteínas MMR avaliadas), 1 paciente para MSH-2 e em 13 pacientes para PMS-2 (onde 2 casos tiveram resultados disponíveis para as 4 proteínas MMR). A presença de fenótipo MSI com perda da expressão de MLH-1 foi

significativamente associada à perda simultânea de PMS-2 ($p<0,001$). Os demais 162 (73%) pacientes foram classificados como MMS, pois tinham a expressão preservada das 4 proteínas MMR avaliadas.

Figura 14. Reação imuno-histoquímica para avaliação da expressão das proteínas MMR. Adenocarcinoma gástrico com fenótipo MSS, apresentando expressão normal da proteína MLH-1 (à esquerda) e tumor com fenótipo MSI (à direita), apresentando perda da expressão MLH-1 (aumento de 7,5x).

Figura 15. Caso com instabilidade de microssatélite (MLH-1 negativo) evidenciando ausência da expressão da proteína nas células tumorais (aumento de 20x).

4.5.1. Fenótipo microssatélite instável e características clínico-patológicas

Conforme apresentado na Tabela 10, os pacientes com MSI apresentaram idade mais avançada quando comparado ao grupo MSS ($p=0,002$). A presença de comorbidades maiores (Charlson ≥ 5) foi também predominante entre os pacientes com MSI (60% vs. 37%, $p=0,002$). Não houve diferença entre os grupos com relação ao IMC ($p=0,308$), NLR ($p=0,462$), ASA ($p=0,647$) e realização de terapia neoadjuvante ($p=0,469$).

A frequência de gastrectomia subtotal foi maior no grupo MSI ($p=0,004$) e, apesar do maior número de LNs dissecados no grupo MSS ($p=0,024$), ambos os grupos apresentam médias superiores a 30 linfonodos (conforme recomendado no 8th TNM)⁹ (Tabela 11).

Observou-se menor frequência de LNM ($p=0,016$) entre os tumores com MSI e estágio final menos avançado da doença ($p=0,018$). Apesar da presença de infiltrado inflamatório com intensidade moderada/intensa ser maior nos tumores com MSI do que nos MSS (40% vs. 27,2%), essa diferença não atingiu significância estatística ($p=0,065$).

Não houve diferença entre os grupos com relação a presença de complicação cirúrgica ($p=0,618$). A maioria dos pacientes com MSS foram submetidos à terapia adjuvante (61,1% vs. 43,3%, $p=0,018$).

Tabela 10. Características clínicas dos pacientes com câncer gástrico de acordo com o status MSS/MSI.

Variáveis	Estado de expressão das proteínas MMR		p
	MSS n=162 (73%)	MSI n=60 (27%)	
Idade (anos)			0,002
Média ($\pm$ DP)	60,1 ($\pm$ 11,5)	65,8 ($\pm$ 12,5)	
Sexo			0,236
Masculino	98 (60,5)	31 (51,7)	
Feminino	64 (39,5)	29 (48,3)	
Localização do tumor			0,217
Proximal	18 (11,1)	6 (10)	
Medial	33 (20,4)	9 (15)	
Distal	103 (63,6)	45 (75)	
Total	8 (4,9)	0 (0)	
Extensão de ressecção			0,004
Subtotal	90 (55,6)	46 (76,7)	
Total	72 (44,4)	14 (23,3)	

Tabela 11. Características anatomopatológicas dos pacientes com câncer gástrico de acordo com o status MSS/MSI.

Variáveis	Estado de expressão das proteínas MMR		<i>p</i>
	MSS n=162 (73%)	MSI n=60 (27%)	
Configuração Macroscópica*			0,103
I/II	35 (23,8)	20 (35,1)	
III/IV	112 (76,2)	37 (64,9)	
Tamanho do Tumor (cm)			0,118
Média (±DP)	4,8 (±3,3)	5,5 (±3,2)	
Grau de diferenciação histológico			0,531
G1 / G2	68 (42)	28 (46,7)	
G3	94 (58)	32 (53,3)	
Tipo histológico de <i>Lauren</i>			0,285
Intestinal	72 (44,4)	34 (56,7)	
Difuso/misto	80 (49,4)	23 (38,3)	
Indeterminado	10 (6,2)	3 (5)	
Invasão tumoral (pT)			0,127
pT1/2	60 (37)	29 (48,3)	
pT3/4	102 (63)	31 (51,7)	
Número de LNs dissecados			0,024
Média	44,1	38,1	
Metástase Linfonodal (LNM)			0,016
Ausente	60 (37)	33 (55)	
Presente	102 (63)	27 (45)	
Invasão Linfática*			0,104
Ausente	81 (50,6)	23 (38,3)	
Presente	79 (49,4)	37 (61,7)	
Invasão venosa*			0,439
Ausente	105 (65,6)	36 (60)	
Presente	55 (34,4)	24 (40)	
Invasão Perineural*			0,216
Ausente	80 (50,6)	36 (60)	
Presente	78 (49,4)	24 (40)	
Infiltrado inflamatório peritumoral			0,065
Ausente/leve	118 (72,8)	36 (60)	
Moderado/intenso	44 (27,2)	24 (40)	
Estadio pTNM			0,018
I/II	82 (50,6)	41 (68,3)	
III/IV	80 (49,4)	19 (31,7)	

* presença de casos não avaliados

4.5.2. MSI e sobrevida

Os pacientes com fenótipo MSI apresentaram SLD significativamente maior que os pacientes com CG MSS (85% vs. 68.8%, $p=0,011$) (Figura 16). Quando ajustado para a presença de LNM, a SLD foi menor no grupo MSS com pN+, embora sem atingir significância estatística (pN0: MSS= 88,9% vs. MSI= 97,0%, $p=0,174$; pN+: MSS= 58,0% vs. MSI= 70,4%, $p=0,188$).

Figura 16. Sobrevida livre de doença dos pacientes com CG MSS e MSI ($p=0,011$) — (Curva de Kaplan-Meier e teste de Log-rank).

Em relação à SG, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo a taxa de sobrevida de 76,7% para o grupo MSI e 69,1% para o grupo MSS ($p=0,116$) (Figura 17). Quando ajustada por estágio, também não houve diferença na SG entre os grupos (pTNM I/II: MSS= 69% vs. MSI= 77,8%, $p=0,336$; pTNM III/IV: MSS= 70,6% vs. MSI= 66,7%, $p=0,827$). Importante notar que enquanto 54 pacientes com MSI tem tumores

pTNM I/II, apenas 6 pacientes com carcinoma gástrico pTNM III/IV apresentaram fenótipo MSI.

Figura 17. Sobrevida global dos pacientes com CG MSS e MSI ($p=0,116$) — (Curva de Kaplan-Meier e teste de Log-rank).

4.6. Análise da imunexpressão de PD-L1

O estudo imuno-histoquímico revelou positividade para PD-L1 em 25 (8,8%) dos 285 carcinomas gástricos avaliados (Figura 18).

A expressão de PD-L1 foi observada em células tumorais (TCs) (Figura 19) e nas células imunes do infiltrado tumoral (TIICs) (Figura 20), mas não no epitélio gástrico não neoplásico. Dezoito casos (6,3%) foram classificados como PD-L1-positivos TCs, com a porcentagem de células tumorais coradas variando de 1 a 80% (média 20,4%, mediana 5%). A porcentagem global de células tumorais positivas para PD-L1 foi baixa (em 55,5% dos casos <10% de células tumorais positivas). A intensidade de coloração foi fraca/leve na maioria dos casos.

Figura 18. Cilindros do TMA com amostra tumoral com reação imuno-histoquímica para PD-L1 negativa (spot esquerdo) e PD-L1 positiva (spot direito) (aumento de 7,5x).

Com relação às células do infiltrado inflamatório, 14 (4,9%) casos foram classificados como PD-L1-positivo TIICs. A porcentagem de células positivas variou de 1 a 30% (média 13,7%, mediana 10%). A maioria dos casos apresentou fraca intensidade de coloração. Sete dos 25 casos avaliados apresentaram positividade para PD-L1 nas TCs e TIICs simultaneamente. Nestes, a média de TCs e TIICs coradas foi de 8,7% e 22,1%, respectivamente.

Entre os casos onde a expressão de PD-L1 foi mais frequente e com maior intensidade de marcação (representada por uma marcação de $\geq 30\%$ das células tumorais e/ou infiltrado), observou-se como característica o predomínio de carcinomas gástricos EBV-positivo, tumores com áreas de padrão sólido, *Lauren* indeterminado, e classificados pela OMS como carcinoma com estroma linfóide (correspondente a quase metade dos casos). Para melhor avaliação da expressão do PD-L1, os casos foram analisados quanto à positividade global, além de separadamente para os grupos PD-L1-positivo TCs e PD-L1-positivo TIICs.

A **B**

Figura 19. Cortes histológicos, (a) carcinoma gástrico com estroma linfóide (HE) e (b) imunoexpressão do PD-L1 positivo nas células tumorais no respectivo caso (aumento de 40x).

A

B

Figura 20. Cortes histológicos, (a) carcinoma gástrico com estroma linfóide (HE) e (b) imunoexpressão do PD-L1 positivo nas células tumorais e células imunes do infiltrado tumoral no respectivo caso (imagem inferior) (aumento de 20x).

4.6.1. Expressão global de PD-L1 e características clínico-patológicas

As variáveis IMC ($p=0,132$), NLR ($p=0,375$), presença de comorbidades ($p=0,507$), ASA ($p=0,573$) e terapia neoadjuvante ($p=0,517$) não se mostraram associadas à expressão de PD-L1.

A expressão global de PD-L1 associou-se significativamente com a configuração macroscópica tipo I/II do tumor ($p=0,002$) e tipo histológico de *Lauren* ($p<0,001$). Observou-se tendência dos tumores PD-L1-positivo apresentarem maior dimensão do que os do grupo PD-L1-negativo ($p=0,056$). Embora a frequência de pacientes classificados como pN0 tenha sido maior no grupo PD-L1-positivo (54,5% vs. 41,9%), não houve diferença estatística quanto a presença de metástase linfonodal ($p=0,175$) e estágio pTNM ($p=0,206$) entre os grupos.

Não foram observadas diferenças com relação à ocorrência de complicação cirúrgica ($p=0,777$) e realização de terapia adjuvante ($p=0,456$) entre os grupos.

A associação da expressão de PD-L1 com os dados clínicos e patológicos são apresentados nas Tabelas 12 e 13, respectivamente.

Tabela 12. Características clínicas dos pacientes com câncer gástrico de acordo com a expressão de PD-L1.

Variáveis	Expressão de PD-L1		<i>p</i>
	PD-L1 Negativo n=260 (91,2%)	PD-L1 Positivo n=25 (8,8%)	
Idade (anos)			0,502
Média (DP)	61,4 ($\pm 11,9$)	63,1 ($\pm 12,6$)	
Sexo			0,318
Masculino	150 (57,7)	17 (68)	
Feminino	110 (42,3)	8 (32)	
Localização do tumor			0,981
Proximal	31 (11,9)	3 (12)	
Medial	48 (18,5)	4 (16)	
Distal	172 (66,2)	17 (68)	
Total	9 (3,5)	1 (4)	
Extensão de ressecção			0,641
Subtotal	158 (60,8)	14 (56)	
Total	102 (39,2)	11 (44)	

Tabela 13. Características anatomopatológicas dos pacientes com câncer gástrico de acordo com a expressão de PD-L1.

Variáveis	Expressão de PD-L1		p
	PD-L1 Negativo n=260 (91,2%)	PD-L1 Positivo n=25 (8,8%)	
Configuração Macroscópica*			0,002
I/II	57 (23,8)	12 (54,5)	
III/IV	183 (76,2)	10 (45,5)	
Tamanho do Tumor (cm)			0,056
Média (±DP)	4,8 (±3,1)	6,4 (±4,0)	
Grau de diferenciação histológico			0,880
G1/G2	119 (45,8)	7 (28)	
G3	141 (54,2)	18 (72)	
Tipo histológico de Lauren			< 0,001
Intestinal	128 (49,2)	8 (32)	
Difuso/misto	127 (48,8)	9 (36)	
Indeterminado	5 (1,9)	8 (32)	
Invasão tumoral (pT)			0,696
pT1/2	104 (40)	9 (36)	
pT3/4	156 (60)	16 (64)	
Nº de LNs dissecados			0,123
Média	41,2	47	
Metástase Linfonodal (LNM)			0,175
Ausente	109 (41,9)	14 (56)	
Presente	151 (58,1)	11 (44)	
Invasão Linfática*			0,928
Ausente	127 (49)	12 (50)	
Presente	132 (51)	12 (50)	
Invasão venosa*			0,170
Ausente	176 (68)	13 (54,2)	
Presente	83 (32)	11 (45,8)	
Invasão Perineural*			0,249
Ausente	129 (50,2)	15 (62,5)	
Presente	128 (49,8)	9 (37,5)	
Infiltrado inflamatório peritumoral			0,103
Ausente/leve	177 (68,1)	13 (52)	
Moderado/intenso	83 (31,9)	12 (48)	
Estadio pTNM			0,163
I/II	139 (53,5)	17 (68)	
III/IV	121 (46,5)	8 (32)	

* presença de casos não avaliados

4.6.2. Expressão de PD-L1 e sobrevida

Conforme apresentado na Figura 21, a SLD nos grupos PD-L1-positivo e PD-L1-negativo foram similares (73,9% vs 73,2%, respectivamente; $p=0,974$)

Quando ajustado para a presença de LNM, o grupo PD-L1-positivo com pN+ apresentou menor SLD comparado ao grupo PD-L1-negativo também com pN+, entretanto sem atingir significância estatística (pN0: PD-L1-negativo: 91,2% vs. PD-L1-positivo: 100%, $p=0,300$; pN+: PD-L1-negativo: 60,8% vs. PD-L1-positivo: 45,5%, $p=0,222$).

Figura 21. Sobrevida livre de doença dos pacientes com CG PD-L1 positivo e PD-L1 negativo ($p=0,974$) — (Curva de Kaplan-Meier e teste de Log-rank).

A SG entre os grupos foi similar (Figura 22), com taxas de 72% para o grupo PD-L1-positivo e de 70,4% para o grupo PD-L1-negativo ($p=0,908$). Do mesmo modo, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos quando ajustado por estadiamento (pTNM

I/II: PD-L1-negativo: 84,9% vs. PD-L1-positivo= 82,4%, $p=0,625$; pTNM III/IV: PD-L1-negativo: 53,7% vs. PD-L1-positivo= 50%, $p=0,737$).

Figura 22. Sobrevida global dos pacientes com CG PD-L1 positivo e PD-L1 negativo ($p= 0,908$) — (Curva de *Kaplan-Meier* e teste de *Log-rank*).

4.6.3. Expressão de PD-L1 no tumor e nas células imunes do infiltrado tumoral: características clínico-patológicas

Nas tabelas 14 e 15 são descritas as características clínicas e anatomopatológicas relacionadas à positividade para PD-L1 de acordo com o padrão de expressão.

Maior frequência de tumores com configuração macroscópica tipo I/II ($p=0,045$) e tipo histológico indeterminado ($p<0,001$) foram características associadas à PD-L1-positivo TCs que mantiveram significância estatística.

Diferente do observado na avaliação global da expressão de PD-L1, tumores pouco diferenciados ($p=0,015$) e a presença de moderado/intenso infiltrado inflamatório peritumoral

($p=0,010$) foram fatores significativos relacionados à expressão tumoral de PD-L1 em análise univariada. As demais variáveis analisadas no grupo PD-L1-positivo TC em relação aos negativos não apresentaram diferenças estatísticas.

Já entre os pacientes PD-L1-positivo TIIC, a maior parte apresentou configuração macroscópica tipo I/II ($p=0,017$) e maior frequência de tumores classificados como *Lauren* indeterminado ($p=0,002$) – assim como o observado nos resultados obtidos na avaliação para a expressão global e tumoral de PD-L1.

Tabela 14. Características clínicas dos pacientes com câncer gástrico de acordo com a expressão de PD-L1 nas células tumorais (TCs) e nas células imunes do infiltrado tumoral (TIICs).

Variáveis	Padrão de expressão do PD-L1		<i>p</i>
	TCs Positivo n=18 (6,3%)	TIICs Positivo n=14 (4,9%)	
Idade (anos)			$p_1= 0,562$
Média ($\pm$ DP)	63,2 ($\pm$ 12,2)	62,8 ($\pm$ 13,5)	$p_2= 0,699$
Sexo			$p_1= 0,225$
Masculino	13 (72,2)	8 (57,1)	$p_2= 0,910$
Feminino	5 (27,8)	6 (42,9)	
Localização do tumor			$p_1= 0,798$
Proximal	3 (16,7)	2 (14,3)	$p_2= 0,465$
Medial	3 (16,7)	1 (7,1)	
Distal	12 (66,7)	10 (71,4)	
Total	0 (0)	1 (7,1)	
Extensão da ressecção			$p_1= 0,354$
Subtotal	9 (50)	7 (50)	$p_2= 0,417$
Total	9 (50)	7 (50)	

p_1 = teste entre PD-L1-positivo TCs vs. PD-L1-negativo TCs; p_2 = teste entre PD-L1-positivo TIICs vs. PD-L1-negativo TIICs.

Tabela 15. Características anatomopatológicas dos pacientes com câncer gástrico de acordo com a expressão de PD-L1 nas células tumorais (TCs) e nas células imunes do infiltrado tumoral (TIICs).

Variáveis	Padrão de expressão do PD-L1		p
	TCs Positivo n=18 (6,3%)	TIICs Positivo n=14 (4,9%)	
Configuração macroscópica*			p₁= 0,045
I/II	8 (47,1)	7 (58,3)	p₂= 0,017
III/IV	9 (52,9)	5 (41,7)	
Tamanho do Tumor (cm)			p₁= 0,067
Média (±DP)	6,7 (±4,1)	6,1 (±4,1)	p₂= 0,159
Grau de diferenciação histológico			p₁= 0,015
G1 / G2	3 (16,7)	6 (42,9)	p₂= 0,917
G3	15 (83,3)	8 (57,1)	
Tipo histológico de <i>Lauren</i>			p₁< 0,001
Intestinal	5 (27,8)	5 (35,7)	p₂= 0,002
Difuso/misto	6 (33,3)	5 (35,7)	
Indeterminado	7 (38,9)	4 (28,6)	
Invasão tumoral - pT			p₁= 0,571
pT1/2	6 (33,3)	6 (42,9)	p₂= 0,801
pT3/4	12 (66,7)	8 (57,1)	
Nº de LNs dissecados			p₁= 0,431
Média	45	47,9	p₂= 0,192
Metástase Linfonodal			p₁= 0,273
Ausente	10 (55,6)	8 (57,1)	p₂= 0,279
Presente	8 (44,4)	6 (42,9)	
Invasão Linfática*			p₁= 0,938
Ausente	9 (50)	8 (61,5)	p₂= 0,359
Presente	9 (50)	5 (38,5)	
Invasão venosa*			p₁= 0,296
Ausente	10 (55,6)	9 (69,2)	p₂= 1,00
Presente	8 (44,4)	4 (30,8)	
Invasão Perineural*			p₁= 0,387
Ausente	11 (61,1)	8 (61,5)	p₂= 0,447
Presente	7 (38,9)	5 (38,5)	
Infiltrado inflamatório peritumoral			p₁= 0,010
Ausente/leve	7 (38,9)	8 (57,1)	p₂= 0,562
Moderado/intenso	11 (61,1)	6 (42,9)	
Estadio pTNM			p₁= 0,293
I/II	12 (66,7)	10 (71,4)	p₂= 0,198
III/IV	6 (33,3)	4 (28,6)	

* presença de casos não avaliados

p₁= teste entre PD-L1-positivo TCs vs. PD-L1-negativo TCs; p₂= teste entre PD-L1-positivo TIICs vs. PD-L1-negativo TIICs.

4.6.4. Expressão de PD-L1 nas células tumorais, células do infiltrado inflamatório e sobrevida

Considerando somente a expressão nas células tumorais, a SLD dos grupos PD-L1 TC negativo e positivo foi similar (73,3% e 72,2 respectivamente, $p=0,802$). Quando ajustado para a presença de LNM (Figura 23), a expressão de PD-L1 no tumor apresentou impacto negativo na SLD nos pacientes com metástase linfonodal (pN+) ($p=0,049$).

Figura 23. Sobrevida livre de doença dos pacientes com CG PD-L1-positivo TC e PD-L1-negativo TC com metástase linfonodal (pN+) ($p=0,049$).

Considerando a expressão no infiltrado, não houve diferenças na SLD entre os grupos PD-L1-positivo TIIC e PD-L1-negativo TIIC (83,3% vs. 72,8%, respectivamente; $p=0,437$), nem quando ajustado para a presença de LNM (pN0: PD-L1-negativo TIIC: 91,7% vs. PD-L1-positivo TIIC: 100%, $p=0,488$; pN+: PD-L1-negativo TIIC: 59,5% vs. PD-L1-positivo TIIC: 66,7%, $p=0,597$).

Em relação à SG, não houve diferenças estatísticas na sobrevida entre os grupos PD-L1-negativo e positivo para TCs (70% vs. 77,8%, respectivamente; $p=0,558$) e nem para TIICs

(70,1% vs. 78,6%, respectivamente; $p=0,839$). Ambos os padrões de expressão também não apresentaram diferenças estatísticas quando ajustado por estágio (expressão tumoral — pTNM I/II: PD-L1-negativo TC: 84% vs. PD-L1-positivo TC= 91,7%, $p=0,501$; pTNM III/IV: PD-L1-negativo TC: 53,7% vs. PD-L1-positivo TC= 50%, $p=0,626$); (expressão no infiltrado — pTNM I/II: PD-L1-negativo TIIC: 84,9% vs. PD-L1-positivo TIIC= 80%, $p=0,356$; pTNM III/IV: PD-L1-negativo TIIC: 52,8% vs. PD-L1-positivo TIIC= 75%, $p=0,432$).

4.6.5. Análise conjunta da sobrevida para os padrões de expressão de PD-L1: tumoral vs. células imunes do infiltrado tumoral vs. tumoral e células imunes do infiltrado tumoral.

Para avaliar o impacto dos diferentes padrões de expressão do PD-L1 com a sobrevida, os pacientes foram divididos nos quatro grupos conforme a positividade para o PD-L1: PD-L1-positivo TC, PD-L1-positivo TIIC, PD-L1-positivo TC e TIIC e PD-L1-negativo.

Utilizando como referência o grupo PD-L1-negativo, não houve diferença na SLD para nenhum dos padrões de expressão (Figura 24). Quando ajustada para a presença de LNM, o grupo PD-L1-positivo TC com pN+ apresentou SLD significativamente menor do que o grupo referência (PD-L1-negativo com pN+) (20% vs 60,8, $p=0,001$) (Figura 25).

Figura 24. Sobrevida livre de doença dos pacientes com CG de acordo com o padrão de expressão do PD-L1 — (Curva de *Kaplan-Meier* e teste de *Log-rank*). O grupo PD-L1 negativo foi utilizado como referência.

Figura 25. Sobrevida livre de doença dos pacientes com CG acordo com a expressão de PD-L1, ajustado para a presença de LNM — (Curva de *Kaplan-Meier* e teste de *Log-rank*). O grupo PD-L1-negativo com metástase linfonodal foi utilizado como referência

Na análise da SG, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 26).

Figura 26. Sobrevida global dos pacientes com CG de acordo com o padrão de expressão do PD-L1 — (Curva de *Kaplan-Meier* e teste de *Log-rank*). O grupo PD-L1-negativo foi utilizado como referência.

4.6.6. Correlação da expressão de PD-L1 com a presença de EBV e MSI

Como apresentado na Tabela 16, a expressão de PD-L1 (global, tumoral e nas células imunes do infiltrado) foi significativamente associada à presença de infecção por EBV. Em relação à microscopia, todos os casos que apresentaram marcação celular mais frequente e mais intensa correspondiam a casos EBV-positivos. Dos 13 tumores EBV e PD-L1-positivo, 5 apresentaram marcação simultânea para as células do tumor e do infiltrado.

Em contrapartida, não se observou diferença com relação à expressão de PD-L1 e o fenótipo de instabilidade. Entre os carcinomas gástricos com MSI positivos para PD-L1, dois apresentaram marcação em células tumorais e do infiltrado simultaneamente. Apenas 8 casos

PD-L1-positivos não tinham nem infecção por EBV e nem fenótipo MSI, sendo portanto EBV-negativo e MSS.

O gráfico da Figura 27 apresenta a distribuição dos casos MSI e EBV-positivo de acordo com a expressão de PD-L1.

Tabela 16. Relação da expressão de PD-L1 com infecção por EBV e fenótipo MSI no câncer gástrico.

Variáveis	Expressão de PD-L1		<i>p</i>
	PD-L1 Negativo	PD-L1 Positivo	
Expressão Global	n=260 (%)	n=25 (%)	
Infecção por EBV			< 0,001
Negativo	243 (93,5)	12 (48)	
Positivo	17 (6,5)	13 (52)	
Microsatélite - Status			0,915
MSS	145 (72,9)	17 (73,9)	
MSI	54 (27,1)	6 (26,1)	
na	61	2	
Expressão Tumoral	n=267 (%)	n=18 (%)	
Infecção por EBV			< 0,001
Negativo	249 (93,3)	6 (33,3)	
Positivo	18 (6,7)	12 (66,7)	
Microsatélite - Status			0,771
MSS	151 (73,3)	11 (68,8)	
MSI	55 (26,7)	5 (31,2)	
na	61	2	
Expressão células imunes do infiltrado	n=271 (%)	n=14 (%)	
Infecção por EBV			0,001
Negativo	247 (91,1)	8 (57,1)	
Positivo	24 (8,9)	6 (42,9)	
Microsatélite - Status			0,764
MSS	151 (72,6)	11 (78,6)	
MSI	57 (27,4)	3 (21,4)	
na	63	0	

na, não avaliados

Figura 27. Pacientes com CG PD-L1 positivo e PD-L1-negativo de acordo com o perfil imuno-histoquímico.

4.7. Síntese dos resultados IHQ: relação com características clínico-patológicas e análise de sobrevida

Para facilitar a visualização global dos parâmetros avaliados, um resumo dos resultados obtidos para cada um dos marcadores IHQ com as respectivas significâncias estatística encontram-se descritos nas tabelas 17 e 18.

Tabela 17. Síntese dos resultados obtidos para a relação dos marcadores IHQ com as características clínico-patológicas.

Variáveis	Resultados IHQ – Valores de <i>p</i>				
	EBV	MSI	PD-L1	PD-L1 TCs	PD-L1 THCs
Idade (anos)	0,973	0,002	0,502	0,562	0,699
Sexo	0,032	0,236	0,318	0,225	0,910
IMC (Kg/cm ²)	0,306	0,308	0,132	0,474	0,968
Razão Neutrófilo/Linfócito	0,431	0,462	0,375	0,187	0,949
Comorbidade	0,562	0,002	0,507	0,811	0,521
ASA	0,876	0,647	0,753	0,974	1,000
Terapia neoadjuvante	0,066	0,469	0,517	0,354	0,071
Localização do tumor	<0,001	0,217	0,981	0,798	0,465
Extensão da ressecção	<0,001	0,004	0,641	0,354	0,417
Configuração Macroscópica	0,313	0,103	0,002	0,045	0,017
Tamanho do Tumor (cm)	0,075	0,118	0,056	0,067	0,159
Grau de diferenciação histológico	0,043	0,531	0,880	0,015	0,917
Tipo histológico de <i>Lauren</i>	<0,001	0,285	< 0,001	< 0,001	0,002
Invasão tumoral (pT)	0,440	0,127	0,696	0,571	0,801
Número de LNs dissecados	0,624	0,024	0,123	0,431	0,192
Metástase Linfonodal	0,699	0,016	0,175	0,273	0,279
Invasão Linfática	0,783	0,104	0,928	0,938	0,359
Invasão venosa	0,506	0,439	0,170	0,296	1,000
Invasão Perineural	0,453	0,216	0,249	0,387	0,447
Infiltrado inflamatório peritumoral	<0,001	0,065	0,103	0,010	0,562
Estadio pTNM (7 ^a edição)	0,553	0,018	0,163	0,293	0,198
Terapia adjuvante	0,856	0,018	0,456	0,967	0,345
Status EBV	—	0,058	<0,001	<0,001	0,001
MSI/MSS	0,058	—	0,915	0,771	0,764
Status PD-L1	<0,001	0,915	—	—	—

Tabela 18. Síntese dos resultados de sobrevida obtidos para os marcadores IHQ avaliados.

Sobrevida	<i>p value (Log rank)</i>				
	EBV	MSI	PD-L1	PD-L1 TCs	PD-L1 THCs
SLD	0,610	0,011	0,974	0,802	0,437
pN0	0,886	0,188	0,300	0,342	0,488
pN+	0,202	0,174	0,222	0,049	0,597
SG	0,432	0,116	0,908	0,558	0,839
pTNM I/II	0,213	0,827	0,625	0,501	0,356
pTNM II/IV	0,686	0,447	0,737	0,626	0,432

4.8. Análise conjunta dos grupos por perfil imuno-histoquímico e prognóstico

A presença simultânea de infecção por EBV e MSI foi um evento pouco frequente. O fenótipo MSI foi visto em apenas dois dos 21 casos EBV-positivos avaliados para a expressão das 4 proteínas MMR (um caso PMS-2 negativo e EBV-positivo; e um caso PMS-2/MLH-1 negativo e EBV-positivo), enquanto que 28,9% dos tumores EBV-negativo apresentaram MSI ($p=0,058$). No gráfico da Figura 28 pode ser observada a frequência de EBV e MSI na população avaliada para os dois parâmetros.

Figura 28. Pacientes com câncer gástrico de acordo com o perfil imuno-histoquímico (n=222)

Com a finalidade de avaliar o impacto prognóstico do EBV e MSI em conjunto nos pacientes com CG, os casos foram divididos de acordo com os resultados obtidos nas reações IHQ em três subgrupos distintos.

A partir de um total de 222 pacientes com resultados de todos os marcadores disponíveis para esta análise, 143 foram classificados como EBV-negativo e MSS, 58 como MSI e 19 como EBV-positivo. Dois pacientes que apresentaram simultaneamente EBV e MSI não foram incluídos na análise.

Utilizando como referência o grupo EBV-negativo e MSS, a SLD foi significativamente maior no grupo com MSI ($p=0,006$) (Figura 29). Não se observou diferenças significativas em relação ao grupo EBV-positivo ($p=0,598$) quando comparado ao mesmo grupo de referência.

Figura 29. Sobrevida livre de doença dos pacientes com CG de acordo com o grupo IHQ — (Curva de Kaplan-Meier e teste de Log-rank). O grupo EBV-negativo/MSS foi utilizado como referência.

Na análise da SG (Figura 30), o grupo MSI associou-se à melhor SG ($p=0,049$) quando comparado ao grupo referência (EBV-negativo e MSS). Não foi observada diferenças na SG para o grupo EBV-positivo ($p=0,118$) em relação ao grupo referência.

Figura 30. Sobrevida global dos pacientes com CG de acordo com o grupo IHQ — (Curva de *Kaplan-Meier* e teste de *Log-rank*). O grupo EBV-negativo/MSS foi utilizado como referência.

4.9. Avaliação dos fatores de impacto prognóstico no CG

O impacto dos fatores clínico-patológicos e dos perfis IHQ na SLD e na SG dos pacientes com CG foram avaliados por meio da determinação dos riscos relativos (“*hazard ratios*”). As variáveis que obtiveram significância estatística na análise univariada foram posteriormente incluídas no modelo multivariado.

Sobrevida livre de doença

Como visto na Tabela 19, as variáveis selecionadas para a análise multivariada foram tipo histológico de *Lauren*, grau de diferenciação, invasão tumoral (pT), metástase linfonodal, invasão linfática, status MSI/MSS e terapia adjuvante.

As variáveis que mantiveram associação após análise multivariada foram invasão tumoral (pT), metástase linfonodal e status MSI/MSS. Maior invasão tumoral (pT3/T4), e presença de metástase linfonodal foram identificados como fatores de risco independentes para pior SLD, enquanto a presença de MSI foi um fator independente associado a melhor SLD nos pacientes com CG.

Tabela 19. Análise univariada e multivariada dos fatores de risco de impacto na sobrevida livre de doença.

Sobrevida livre de doença Variáveis*	Análise Univariada			Análise Multivariada		
	HR	I.C. 95%	p	HR	I.C. 95%	p
Masculino (vs. feminino)	1,12	0,70 - 1,80	0,636	—	—	—
Idade > 65 anos (vs ≤ 65)	0,64	0,39 - 1,05	0,078	—	—	—
Difuso/misto (vs. outros)	1,64	1,03 - 2,62	0,038	0,84	0,41 - 1,77	0,651
G3 (vs G1/G2)	2,25	1,34 - 3,75	0,002	1,97	0,89 - 4,37	0,097
Status pT3/T4 (vs. pT1/T2)	11,8	4,76 - 29,33	<0,001	6,32	2,08 - 19,18	0,001
pN+ (vs. pN0)	6,70	3,33 - 13,48	<0,001	2,48	1,02 - 6,07	0,046
Inv. linfática (vs. ausência)	2,98	1,78 - 4,98	<0,001	1,32	0,71 - 2,45	0,369
EBV-positivo (vs. negativo)	1,20	0,60 - 2,41	0,613	—	—	—
MSI (vs. MSS)	0,41	0,20 - 0,84	0,015	0,48	0,23 - 0,99	0,049
PD-L1-positivo (vs. negativo)	1,01	0,44 - 2,34	0,975	—	—	—
QT neoadjuvante (vs. ausência)	1,39	0,73 - 2,64	0,313	—	—	—
QT adjuvante (vs. ausência)	0,21	0,11 - 0,40	<0,001	1,01	0,45 - 2,27	0,976

*a categoria entre parênteses serviu como referência; QT, quimioterapia

Sobrevida Global

Conforme apresentado na Tabela 20, as variáveis que apresentaram significância estatística na análise univariada e foram incluídas no modelo multivariado foram: extensão da ressecção cirúrgica, tipo histológico de *Lauren*, grau de diferenciação histológico, invasão tumoral e metástase linfonodal.

Após análise multivariada, gastrectomia total e maior nível de invasão tumoral (pT3/T4) foram fatores independentes associados a diminuição da sobrevida global.

Tabela 20. Análise univariada e multivariada dos fatores de risco de impacto na sobrevida global.

Sobrevida Global Variáveis*	Análise Univariada			Análise Multivariada		
	HR	I.C. 95%	p	HR	I.C. 95%	p
Masculino (vs. feminino)	1,05	0,68 - 1,63	0,817	—	—	—
Idade > 65 anos (vs. ≤ 65)	1,22	0,80 - 1,88	0,357	—	—	—
Gastrectomia total (vs. subtotal)	2,22	1,44 - 3,41	<0,001	1,85	1,20 - 2,85	0,006
Difuso/misto (vs. outros)	1,58	1,02 - 2,44	0,039	0,95	0,53 - 1,72	0,873
G3 (vs. G1/G2)	2,03	1,27 - 3,26	0,003	1,58	0,83 - 2,99	0,164
Status pT3/T4 (vs. pT1/T2)	4,46	2,46 - 8,05	<0,001	3,09	1,60 - 5,96	0,001
pN+ (vs pN0)	2,90	1,75 - 4,80	<0,001	1,52	8,86 - 2,68	0,147
EBV-positivo (vs. negativo)	0,73	0,34 - 1,59	0,436	—	—	—
MSI (vs. MSS)	0,63	0,35 - 1,32	0,121	—	—	—
PD-L1-positivo (vs negativo)	1,05	0,48 - 2,27	0,909	—	—	—
QT neoadjuvante (vs. ausência)	1,02	0,53 - 1,98	0,947	—	—	—
QT adjuvante (vs. ausência)	0,71	0,45 - 1,11	0,136	—	—	—

*a categoria entre parênteses serviu como referência; QT, quimioterapia

5. DISCUSSÃO

O CG é uma doença caracterizada por diferenças epidemiológicas, biológicas e moleculares, para a qual o único tratamento potencialmente curativo é a ressecção cirúrgica. No entanto, as atuais classificações histopatológicas utilizadas na prática clínica não refletem a heterogeneidade do CG e não atendem as necessidades de diagnóstico e terapia individualizada. Como resultado, pacientes são comumente tratados de modo uniforme, independentemente do subtipo de doença.

Além disso, observa-se grande variação nos resultados clínicos em pacientes com o mesmo estágio e regimes de tratamento semelhantes. As opções terapêuticas são limitadas, com frequente ineficácia ou baixa resposta aos regimes quimioterápicos, tornando evidente a necessidade de melhorar a compreensão da patogênese da doença e de se identificar estratégias terapêuticas que sejam mais eficientes aos pacientes com CG.

Esse cenário levou a comunidade científica a investigar biomarcadores e alterações genéticas envolvidas na gênese tumoral. O desenvolvimento de tecnologias genômicas junto às plataformas de sequenciamento em larga escala permitiram que o CG fosse investigado a nível molecular, levando à identificação de alterações genéticas e epigenéticas que auxiliaram o desenvolvimento de novas classificações.^{7, 101-103}

Dados recentes baseados em estudos de perfil de expressão gênica sugerem que o CG é uma doença complexa que compreende quatro classes principais denominadas “subtipos moleculares”.⁷ A adição dessa classificação molecular ao atual sistema de classificação mostra-se bastante promissora, pois permite não só a melhor compreensão da doença e um prognóstico mais preciso, mas também abre a possibilidade para o desenvolvimento de terapias personalizadas, especialmente no que se refere aos subgrupos EBV e MSI.¹⁰⁴

Deste modo, o presente estudo investigou os subtipos de CG EBV-positivo e MSI, bem como a expressão de PD-L1, em espécimes de CG ressecados cirurgicamente utilizando técnicas diagnósticas disponíveis na rotina anatomopatológica. Os resultados demonstraram que as metodologias de IHQ e ISH são capazes de identificar os subtipos de CG, revelando dois grupos com características distintas e bem definidas, reproduzindo parcialmente a classificação molecular.

No presente estudo, 10,5% dos CGs eram EBV-positivo e 27% apresentaram MSI, frequências similares às apresentadas pelo grupo TCGA, (9% e 22% dos CGs, respectivamente).⁷ A frequência de MSI foi também similar a descrita pelo *Asian Cancer Research Group* (ACRG), correspondendo a 22,7% dos casos.⁷³

Os CGs EBV-positivo e MSI têm sido apresentados como entidades clinico-patológicas distintas, cada um representado por um conjunto de características particulares que sustentam a definição destes como subtipos diferentes de doença.

Os tumores EBV-positivo caracterizam-se pela proliferação monoclonal de células neoplásicas com infecção latente por EBV.⁵⁰ Em nossos casos de CG EBV-positivo observamos a presença do vírus no núcleo de todas as células tumorais, o que além de evidenciar a origem clonal do tumor reflete que a infecção viral ocorre no estágio inicial do desenvolvimento neoplásico. Sugere-se que as células epiteliais do estômago iniciam o crescimento clonal depois de serem infectadas com EBV a partir da reativação de linfócitos portadores do vírus.²²

Em relação aos dados clínicos observados na série avaliada, conforme descrito na literatura o EBV foi predominantemente encontrado em pacientes com CG do sexo masculino.⁵⁰ Poucos relatam frequências similares entre as populações feminina e masculina. Acredita-se que esse predomínio seja atribuído à características genéticas e fatores epidemiológicos relacionados ao estilo de vida, que podem levar a maior exposição da população masculina à fatores de risco, tais como dieta rica em sal e tabagismo.^{105, 106} O que sugere que além da infecção pelo EBV, a associação de outros fatores ambientais podem estar envolvidos no desenvolvimento do CG EBV-positivo.⁵¹

A idade dos pacientes EBV-positivo foi semelhante aos casos EBV-negativos (61,4 e 61,5 anos respectivamente), em concordância com outros trabalhos.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Entretanto, alguns autores associam o CG EBV-positivo a pacientes jovens, possivelmente devido à maior chance de reativação do vírus nessa população do que em idosos com o sistema imune reprimido.^{59, 110}

Entre outras características, um maior acometimento da porção gástrica proximal e estômago remanescente após gastrectomia é com frequência associado ao CG EBV-positivo.⁵⁰ Confirmado na presente série, observamos associação entre a positividade para EBV e localização do tumor no terço proximal. Entretanto, não somos capazes de verificar se tal associação se mantém nos tumores de coto gástrico e/ou estômago remanescente, uma vez que não foram incluídos casos de degastrectomia no presente trabalho.

Apesar da infecção pelo EBV ocorrer em qualquer tipo de adenocarcinoma gástrico, sua frequência é mais comum em tumores associados à presença de infiltrado linfocitário proeminente, tumores com padrão sólidos e histologia pouco diferenciada.^{51, 22, 111} Confirmado no presente estudo, o EBV associou-se a CG pouco diferenciados e do tipo indeterminado, os

quais compreendem principalmente tumores de padrão sólido e os carcinomas gástricos com estroma linfóide.

De modo geral, atribui-se ao CG EBV-positivo menor agressividade comparado aos demais tipos de CG, consequentemente apresentando menor invasão tumoral e baixa incidência de metástase linfonodal.^{103, 112, 113} Contudo, isso não foi evidenciado neste estudo. Uma possível explicação para os achados desta pesquisa é que talvez as características que contribuem para um melhor prognóstico sejam observadas apenas no CG EBV-positivo do tipo “*linfoepitelioma-like*”, caracterizado pelo seu intenso infiltrado linfocitário.^{54, 55, 114} Acredita-se que a infiltração linfocitária típica desse subtipo histológico, e por consequência comumente associada ao CG EBV-positivo, possa ser considerada como uma reação imune do hospedeiro contra células tumorais, diminuindo assim as chances de progressão e disseminação da doença.¹¹⁴ Tal interpretação sugere que aplicação desta subclassificação histológica pode ser útil para prever o prognóstico não apenas do CG EBV-positivo, mas também de outros tipos histológicos de CG com EBV-negativo, uma vez que nestes podemos também notar a presença de resposta imune celular do hospedeiro.

Em relação ao prognóstico, o status para EBV não se associou com a sobrevida dos pacientes. Embora alguns trabalhos relatem sobrevida relativamente maior no CG EBV-positivo em comparação aqueles EBV-negativos, essa associação ainda não está bem estabelecida.^{59, 115}

Assim como o CG EBV-positivo, a presente investigação também examinou as características relacionadas aos tumores com MSI. O tipo de MSI mais frequente no CG ocorre através do silenciamento do gene de reparo humano MuL homolog 1 (hMLH1) por hipermetilação. Nos casos avaliados, a perda simultânea da expressão de MLH1 e PMS2 foi o tipo de instabilidade mais comum (60% neste estudo), assim como também descrito por Kim et al¹¹⁶, no qual correspondeu a 71,4% dos casos de CG com MSI.

Notavelmente, a presença de infecção por EBV e MSI são eventos mutuamente exclusivos. Em nossa casuística apenas dois casos apresentaram infecção por EBV e MSI simultaneamente, o que sugere que os dois subtipos de CG apresentam vias carcinogênicas distintas. Observações semelhantes foram descritas em estudos anteriores que avaliaram EBV e MSI nos tumores de estômago.^{112, 117}

Com relação às características clínico-patológicas, a presença de MSI no CG confirmou-se mais frequente em pacientes com idade avançada, uma vez que as alterações epigenéticas como a metilação se intensificam com o aumento da idade.¹¹⁸ Assim como relatado por Kim et al.¹¹⁶, não observamos associação significativa com relação à localização

tumoral. Entretanto, a frequência de gastrectomia subtotal foi significativamente maior entre os CGs com MSI, o que pode não apenas decorrer do acometimento do terço inferior do estômago nestes casos,^{73, 112} mas também devido a idade mais avançada dos pacientes, sendo mais vezes realizada gastrectomia subtotal pela morbimortalidade perioperatória associada à total. Além disso, estádios T e N menos avançados são fatores que também influenciam a adoção da gastrectomia subtotal.

Entre outros aspectos, os CGs com MSI são comumente descritos como lesões de maior diâmetro quando comparados aos MSS.^{72, 119} Na presente série os tumores com MSI apresentaram-se como lesões mais extensas (5,5 vs 4,8 cm), embora essa diferença não tenha atingido significância estatística.

Morfológicamente, o CG MSI é geralmente associado à histologia intestinal.^{73, 112} o qual sabe-se que apresenta maior instabilidade genômica em comparação ao tipo difuso. A frequência maior dessas alterações pode também ser atribuída à influência da fatores ambientais na carcinogênese do CG intestinal, tais como a infecção por *H. pylori*, que pode levar à MSI através da intensificação da metilação do MLH-1.¹²⁰ Entretanto, similar aos resultados deste estudo, dados provenientes de uma pesquisa que também utilizou métodos IHQ para determinação dos subgrupos mostrou não haver associação do fenótipo MSI com o tipo histológico (53% dos CGaMSI eram do tipo intestinal de *Lauren* e 47% do tipo difuso).¹²¹ Embora não demonstre associação com o tipo histológico intestinal, o presente estudo confirma a associação com menor frequência de metástase linfonodal e estágio menos avançado (63% vs 45% de casos pN+, $p = 0,016$; e 49,4 vs 31,7% de casos pTNM III/IV, $p = 0,018$). Uma vez que são geralmente associados a melhor prognóstico,^{119, 122} essa observação reflete a menor agressividade biológica e tendência à maior sobrevida neste grupo de pacientes. Dos 21 estudos descritos em meta-análise que avaliam a relação da MSI com a sobrevida, 13 relacionam a presença de MSI a melhor sobrevida, enquanto os demais 8 não encontram diferenças comparado aos MSS.⁷³

Recentemente, identificaram-se características que sugerem especificamente que o CG EBV-positivo e MSI podem ser os principais candidatos ao tratamento através do uso de agentes imunoterápicos, particularmente no que diz respeito à terapia dirigida com PD-1/PD-L1.^{7, 43, 89}

O PD-L1 é uma glicoproteína transmembrana expressa por vários tipos de células do sistema imunológico (como linfócitos e células dendríticas), mas que também pode ser expresso em células tumorais.⁸⁰ Nos tumores gástricos, resultados publicados em meta-análise mostram que a positividade do PD-L1 varia de 14,3 a 69,4%.¹²³ No presente estudo, apenas

8,8% dos pacientes tiveram expressão de PD-L1 em TCs e/ou THCs – frequência relativamente menor comparado as taxas anteriormente descritas; e também inferior aos 40% de positividade observados no ensaio clínico de fase I do pembrolizumab para CG avançado.⁴³ A maior parte destes estudos, porém, envolvem casuísticas asiáticas. Ao verificar dois estudos americanos, a expressão de PD-L1 em pacientes com tumores gastro-esofágicos variou de 2 a 12%,⁸² valores estes que se aproximam aos encontrados nesta população.

A ligação de PD-L1 ao seu receptor PD-1 (expressa em células T ativadas) pode levar a inibição da sinalização do receptor de células T e resultar na supressão da resposta imunitária, o que permite que as células tumorais escapem da destruição imune. Assim, a terapia com anti-PD-L1/PD-1 é capaz de impedir esta interação, a fim de restaurar a resposta imune contra as células tumorais.⁷⁸

Em geral, existem dois mecanismos para a expressão de PD-L1 em TC: resistência imune inata e resistência imune adaptativa. Na resistência imune inata, a sinalização constitucional oncogênica induz a expressão de PD-L1 nas TC; enquanto que nos casos de resistência imune adaptativa, a regulação positiva de PD-L1 em TCs é induzida pelas células T infiltradas no tumor.⁷⁸ O presente estudo demonstrou que o CG com PD-L1-positivo nas TCs associou-se a presença de infiltrado inflamatório intenso (61,1% dos casos), o que pode sugerir que a resistência imune adaptativa contribui mais para a expressão de PD-L1 no CG do que a resistência imune inata.

Ainda que a expressão de PD-L1 seja evidenciada em qualquer tipo de adenocarcinoma, vários pesquisadores relatam que sua expressão no CG é maior especialmente no que diz respeito aos tumores EBV-positivos e com MSI.^{7, 42, 88}

Em estudo realizado com 487 pacientes, a expressão de PD-L1 foi mais frequente no CG MSI do que no grupo MSS, tanto para as TCs (72,0 % vs 20,1%, $p < 0,001$) quanto para as THCs (96,0% vs 59,5%, $p < 0,001$). Da mesma forma, a positividade de PD-L1 nas TCs (52,0% vs 21,2%, $p = 0,001$) e THCs (80,0% vs. 60,4%, $p < 0,001$) mostrou-se mais frequente no CG EBV-positivo em comparação aos casos EBV-negativos.⁴² Similar a estes achados, o presente estudo demonstrou associação significativa entre a expressão de PD-L1 e a presença de infecção por EBV. A positividade para EBV foi observada 52% dos casos PD-L1-positivo e em apenas 6,5% dos casos PD-L1-negativos. Já com relação ao perfil de instabilidade, diferente dos resultados anteriormente descritos não se observou diferenças na expressão de PD-L1 com relação ao status MSI/MSS.^{42, 88}

Assim, nossos achados sugerem que os anticorpos anti-PD-1/PD-L1 podem ter mais eficácia terapêutica no CG EBV-positivo. Nesse sentido, é importante ressaltar que o status

para infecção por EBV não foi um dado coletado no ensaio clínico fase 1b KEYNOTE-012. Portanto, não temos evidências se há associação entre positividade para EBV e sensibilidade à terapia no contexto da imunoterapia com pembrolizumab.⁴³ Em contraste, o pembrolizumab mostra eficácia promissora em pacientes com MSI, uma vez que o status para MSI foi um dado considerado no estudo.⁸⁹

Além da imunoexpressão de PD-1/PD-L1, outras características podem ser descritas para suportar a conjectura de que os tumores com EBV e MSI são subtipos que poderiam se beneficiar de terapia anti-PD-1/PD-L1. O estudo TCGA demonstrou que o gene IFN- γ pode funcionar como marcador adicional de sensibilidade à terapia com PD-1, e geralmente está hiperexpresso nos CGs EBV-positivos e com MSI.⁷ O IFN- γ desempenha papel importante na resposta imune adaptativa no CG EBV-positivo e em tumores com MSI, e sua liberação pelos linfócitos T pode induzir diretamente a expressão de PD-L1.¹²⁴ Além disso, a inibição do PD-1/PD-L1 por meio de agentes imunoterápicos parece ser mais eficaz em tumores com resposta antitumoral preexistente — especialmente com a presença de LT CD8. Por sua vez, os CG EBV e MS são frequentemente associados à intensa infiltração linfocitária no estroma tumoral, apresentando elevado número de células T CD8 capazes de produzir uma resposta antitumoral acentuada.^{107, 125, 126}

Essas observações explicam o porquê a resposta antitumoral caracterizada pelo intenso infiltrado linfocitário tem sido grande alvo de estudos e apontada como um dos principais fatores associados a melhor sobrevida em pacientes com CG. A reação imunológica do hospedeiro, gerada em resposta tanto à infecção por EBV quanto aos antígenos imunogênicos gerados devido à reparação inadequada do DNA, parece influenciar o prognóstico e pode ser uma explicação para o padrão distinto de sobrevivência observada nesses dois subtipos.^{55, 107} Por este motivo um dos principais destaques da classificação molecular refere-se à melhor definição prognóstica baseada na divisão de subgrupos, onde os subtipos EBV e MSI estariam relacionados à melhor sobrevida.^{7, 101, 112} No entanto, no presente estudo apenas o MSI associou-se significativamente à melhor sobrevida, confirmando-se como fator independente associado a maior SLD. Talvez outros fatores relacionados à infecção por EBV, como a proporção de linfócitos no infiltrado tumoral, também desempenham um papel na determinação do prognóstico ao invés da infecção por EBV avaliada isoladamente. Já que melhor prognóstico está associado principalmente quando os linfócitos T CD3+ e CD8+ são predominantes no infiltrado inflamatório, representando assim a atividade antitumoral.^{42, 87, 107} Além disso, no contexto do CG EBV-positivo, não podemos descartar a hipótese de que outros marcadores que exerçam impacto prognóstico possam estar alterados nesses tumores,

tais como o p53 e a e-caderina,¹¹² fazendo com que essa tendência a melhor prognóstico não seja evidenciada.

Em relação à PD-L1, o impacto prognóstico de sua expressão em pacientes com CG permanece controverso. Em geral, os estudos envolvem casuísticas pequenas e poucas meta-análises apresentam associação entre PD-L1 e prognóstico.^{80, 81, 123, 127} Alguns autores mostraram que a positividade para PD-L1 está associada a pior prognóstico no CG avançado,^{128, 129} enquanto outros propõe que o aumento da expressão de PD-L1 relaciona-se a melhor prognóstico.^{83, 87} Ainda assim, alguns autores não mostraram nenhum impacto na sobrevida.^{42, 109} No caso da população avaliada neste trabalho, não foi observada associação entre a expressão de PD-L1 e o prognóstico dos pacientes com CG. Além disso, diferente de trabalhos anteriores observamos que a expressão da proteína PD-L1 foi mais frequente em TCs do que em TIICs.^{42, 83} No presente estudo, menor sobrevida foi observada apenas em um grupo restrito de pacientes representados pelos CG com metástase linfonodal que apresentaram positividade para PD-L1 em células tumorais. De fato, apenas 25 pacientes apresentaram positividade para PD-L1, o que pode ter limitado a análise de sobrevivência. Além disso, essa variabilidade nos resultados relatados pode ser influenciada em parte pela coorte de pacientes, uma vez que 55,1% dos CG correspondiam ao estadió pTNM I/II, e a expressão elevada de PD-L1 parece estar relacionada a tumores com estadió mais avançados.
83, 123, 128

Independente do impacto que exerce na sobrevida, o potencial do PD-L1 como alvo prognóstico tem sido ainda o principal foco de estudos. Os resultados dos ensaios clínicos com anticorpos anti-PD-1/PD-L1 para o tratamento de CG avançado até o momento disponíveis demonstram que seu uso pode representar uma opção clínica promissora para os subgrupos moleculares,^{43, 89, 94} Recentemente, com a aprovação do anticorpo monoclonal PD-1 pembrolizumab pela *United States Food and Drug Administration* (US-FDA), a avaliação de biomarcadores preditivos que podem servir como indicação terapêutica para tratamentos mais específicos torna-se cada vez mais importante no diagnóstico de rotina.

Entretanto, é necessário considerar alguns aspectos metodológicos para que se possa buscar a padronização dos métodos de avaliação, uma vez que a variabilidade em termos de técnica e interpretação de resultados impede uma comparação honesta entre os trabalhos, limitando assim a generalização dos resultados.

Considerações metodológicas e validação do estudo

A escolha da técnica de TMA foi fundamental para possibilitar a inclusão de um número grande de pacientes, permitindo a análise do EBV e da expressão das proteínas MMR e PD-L1 em larga escala. Estudos demonstram que amostras em duplicatas são suficientes para representar a área tumoral.¹³⁰ No presente trabalho, cada caso foi representado por três cores (ou spots) a fim de reduzir as perdas físicas e/ou de representatividade inerentes ao método, bem como ampliar a representatividade em relação a diferentes áreas da neoplasia primária. Adicionalmente, incluímos dois cores de tecido não-tumoral, que serviram também como controle para as reações. A perda da análise (devido à perda nos cortes, baixa representatividade tumoral ou inconclusividade da reação) foi de 1 a 18,8% para cada marcador examinado, sendo o MSH2 o que apresentou maior perda. Essa frequência está de acordo com o descrito na literatura, que considera aceitável a não representação de até 20% dos casos.¹³⁰

Embora os estudos de base genômica representem um progresso significativo do ponto de vista biológico,¹³¹ a disseminação de uma classificação molecular ainda é limitada pela falta de alcance clínico ou mesmo pela falta de aplicabilidade clínica imediata. Além disso, as tecnologias genômicas para uma classificação molecular completa são altamente complexas e com custo elevado, fatores estes que impedem seu uso generalizado na prática diagnóstica.

No presente estudo, os CGs EBV-positivo e MSI foram categorizados como dois subtipos histológicos distintos usando metodologias bem definidas e facilmente reprodutíveis para avaliar se tal subclassificação pode ser útil na predição do prognóstico. Nesse sentido, conseguimos superar dois principais obstáculos para abordagem das assinaturas moleculares na prática diagnóstica: a relação custo-eficácia e a complexidade técnica. Os resultados através do uso das metodologias de IHQ e ISH — disponíveis na rotina anatomopatológica convencional — foram consistentes com os estudos moleculares descritos recentemente, e os métodos utilizados são simples e de menor custo, permitindo assim sua abordagem na prática diagnóstica.

O desenvolvimento da técnica de ISH para a detecção de RNAs codificados pelo EBV facilitou a pesquisa do vírus em tecidos neoplásicos, fazendo da reação para o transcrito viral EBER1 o padrão-ouro para a identificação do CG associado ao EBV. A escolha do EBER justifica-se pelo fato dos carcinomas gástricos EBV-positivo manterem sua infecção em estado de latência do Tipo I, onde o EBER é um dos produtos virais mais expressos pelas células infectadas (até 107 moléculas/células).^{50, 59} Já a IHQ para LMP-1 não é um método

eficiente, pois sua expressão é ausente ou extremamente baixa nos CG EBV-positivo, e geralmente não detectável.

Embora alguns estudos utilizem a técnica de PCR para detecção do EBV,^{54, 132} é importante considerar a chance de resultado falso-positivo para a determinação do CG associado ao EBV por este método, uma vez que pela técnica não somos capazes de afirmar se a positividade se refere às células tumorais. Assim como relatado por outros autores,¹³² a presença de positividade para EBV em TIIC foi observada em um de nossos casos que foi negativo para infecção pelo vírus nas células tumorais. Esse achado indica a presença dispersa de EBV em linfócitos no trato digestivo e enfatiza a necessidade de usar métodos morfológicos ao avaliar a infecção pelo vírus em tumores do aparelho digestivo.

A instabilidade de microssatélite foi definida por IHQ através da pesquisa das 4 proteínas MMR, onde o fenótipo MSI caracteriza-se pela perda da expressão de uma ou mais proteínas de reparo.⁷⁰ A avaliação da expressão das MMR é uma técnica bem estabelecida e eficiente na determinação do status MSI,¹¹⁹ e utilizada com frequência no diagnóstico diferencial da Síndrome de Lynch (ou HNPCC). Em estudo conduzido por Halling et al.,⁷⁰ todos os casos classificados como MSI-H por métodos moleculares (PCR) exibiram também perda da expressão IHQ, comprovando a concordância entre ambos os métodos. O uso da técnica de PCR para a instabilidade dos microssatélites foi também equivalente à IHQ para a detecção de HNPCC.¹³³ Em estudo conduzido com pacientes com CG avançado no qual 203 apresentavam MSI e 261 eram MSS, a IHQ em comparação com a análise baseada em PCR foi um teste sensível (91,1%) e específico (98,5%) na detecção do fenótipo MSI, confirmando a eficácia do método na aplicação diagnóstica.¹¹⁹

A escolha da quantidade de marcadores avaliados é um aspecto também importante para a correta determinação do status MSI. No presente estudo avaliaram-se as 4 principais proteínas MMR. Considerando que estas atuam em dímeros (MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6), alguns estudos colocam que a avaliação de pelo menos uma das proteínas dos pares permite a definição do status MSI/MSS com efetividade.^{119, 134}

Entretanto, apesar de amplamente utilizado na prática clínica, a determinação do perfil de instabilidade também demonstra resultados variados na literatura.¹³⁵ Parte disso pode ser atribuída à ausência de padronização na metodologia do diagnóstico, uma vez que a literatura apresenta heterogeneidade no painel de marcadores moleculares, assim como no número de genes avaliados. Além disso, os critérios usados para definição do fenótipo MSI também são variados, a depender da quantidade e qualidade dos marcadores alterados. Alguns estudos utilizam as categorias MSS, MSI-L e MSI-H, conforme recomendado pelos critérios de

Bethesda.¹³⁶ Enquanto outros utilizam apenas a definição qualitativa do fenótipo MSI, independentemente de quantos ou quais marcadores estão alterados.⁶⁹

Realizou-se também através de IHQ avaliação do PD-L1, conforme utilizado em outros trabalhos. No entanto, uma interpretação precisa dos resultados IHQ ainda é essencial para validar o potencial do PD-L1 como marcador biológico. As discrepâncias nos resultados observados na literatura podem ser explicadas, em parte, pela ausência de um critério de avaliação bem estabelecido para sua expressão e pela falta de homogeneidade entre os estudos. Valores de corte (*cutoff*) ideais parecem ainda necessários para determinar sua positividade no CG, de modo a fornecer informações tanto prognósticas (definir valor de corte para grupo com melhor e pior prognóstico) quanto terapêuticas (definir valor de corte para indicação ou não à terapia alvo com anti-PD-L1). Claramente, observa-se que os valores de corte para definir a positividade do PD-L1 são variados (de >1% a 50%, usamos > 1%) e não há uma definição exata de qual padrão de expressão deve ser avaliado (TC, TIIC ou ambos) e dos clones de anticorpos utilizados. Além disso, no contexto pré-operatório o diagnóstico de expressão de PD-L1 por biópsia deve ser factível.

No caso do EBV, na presença de infecção pelo vírus as células tumorais serão predominantemente positivas na reação de ISH. Do mesmo modo, se o CG apresentar MSI a perda da expressão das MMR será observada na maior parte das células tumorais. Entretanto, no caso do PD-L1 é importante ressaltar alguns aspectos: observou-se que a porcentagem de células tumorais PD-L1-positiva de modo geral é baixa e de distribuição difusa; e a avaliação da porcentagem de células positivas de acordo com a intensidade da coloração (três intensidades: fraca, moderada e forte), foi indiscernível e não viável na prática. Em estudo com pacientes de adenocarcinoma de esôfago em que os resultados do TMA utilizando 2 cores de tumor foram validados nas lâminas com a fatia inteira do tumor, a IHQ para PD-L1 mostrou que 16/45 casos (35,6%) apresentavam positividade em TIICs, dos quais 7/16 não foram identificados no TMA. Em 5 casos as células imunes PD-L1 positivas foram observadas apenas na periferia do tumor, enquanto nos 11 pacientes restantes as células positivas se infiltravam no tumor.¹³⁷

Assim, é aconselhável que a avaliação IHQ seja realizada através de múltiplos espécimes de biópsia, de diferentes áreas do tumor, para evitar resultados falso-negativo para a expressão de PD-L1. Além da expressão de PD-L1 e do status EBV e MSI, pode ser importante determinar outras características clinico-patológicas com implicações clínicas que possam adicionalmente servir como marcadores alternativos para a expressão de PD-L1/PD-1 a fim de aperfeiçoar a indicação terapêutica. A presença de intenso infiltrado inflamatório

peritumoral, assim como a visualização de tumores de padrão sólido, são exemplos que podem sugerir a necessidade de uma avaliação adicional através da pesquisa IHQ para PD-L1..

Limitações do Estudo

Algumas limitações no presente trabalho devem ser consideradas. Trata-se de um estudo unicêntrico, alguns grupos apresentaram número pequeno de casos (particularmente o grupo PD-L1-positivo) e alguns pacientes tem um tempo de seguimento relativamente curto. Na análise multivariada não consideramos o tipo de terapia adjuvante, que pode ter influência na sobrevivência pela administração de diferentes regimes com diferentes esquemas.

Em relação às limitações técnicas, conforme anteriormente citado não podemos excluir o risco de resultados falso-negativos para PD-L1 (devido à sua expressão heterogênea e ao fato da técnica de TMA não avaliar o tumor em sua totalidade).¹³⁰ Além disso, como o número de tumores com expressão de PD-L1 foi relativamente pequeno, categorizamos nossos resultados em PD-L1-positivo e PD-L1-negativo. Deste modo, não somos capazes de avaliar se diferenças na porcentagem de células positivas podem ter um impacto diferente na biologia do tumor e correlacionar-se com a sobrevida do paciente.

Em relação ao risco de viés, algumas medidas foram tomadas visando garantir a validação do estudo. Para uma avaliação confiável da sobrevida e de outras variáveis cirúrgicas relacionadas ao prognóstico, consideram-se elegíveis apenas os pacientes submetidos à gastrectomia com linfadenectomia D2. O número médio de LNs dissecados foi alto, atestando a alta qualidade da cirurgia e avaliação patológica. Além disso, a adoção da solução de Carnoy na instituição como solução reveladora de linfonodos salienta o baixo risco de subestadiamento, já que comparada ao formol o número de linfonodos obtidos na fixação do tecido com Carnoy é significativamente maior (50,4 vs 34,8 LNs, $p < 0.001$).^{138, 139} Esse risco mostra-se ainda reduzido, uma vez que IHQ para citoqueratinas (CK AE1/AE3) foi realizada para a detecção de células tumorais ocultas em casos selecionados.¹⁴⁰ Além disso, incluíram-se apenas casos com confirmação de adenocarcinoma gástrico por exame anatomopatológico do serviço. Variantes histológicas como os tumores neuroendócrinos e GIST, além de tumores de coto gástrico, não foram selecionados para o estudo. Para evitar a perda de casos e fornecer uma representação de diferentes áreas tumorais, avaliaram-se três cores de tumor por paciente. Foi utilizada uma definição padronizada de análise de IHQ/ISH, e os resultados finais apresentados categoricamente, o que torna a análise facilmente

reprodutível e com baixo risco de discordância entre examinadores. Além disso, pouco discriminado por outros pesquisadores, examinamos a expressão de PD-L1 em células tumorais e células imunes, expondo seus resultados individualmente e em conjunto, uma vez que não está claro se há diferenças no prognóstico e resposta à terapia entre ambos os padrões de expressão. Ademais, essa pesquisa foi conduzida em um centro público de alto volume, especializado no tratamento do câncer. Todos os pacientes foram operados com intenção potencialmente curativa por cirurgiões especialistas, altamente treinados no tratamento do câncer gástrico.

Considerações finais

Os achados desta pesquisa representam uma primeira tentativa de estabelecer grupos de CG através do padrão de expressão proteica em uma grande e bem caracterizada coorte ocidental de pacientes com CG após ressecção curativa. A investigação atual pode ter implicações clínicas importantes para o tratamento do CG, uma vez que — além de confirmar o status de MSI como fator preditivo de melhor prognóstico e demonstrar que a correlação da expressão de PD-L1 com EBV pode orientar a indicação à imunoterapia — os dados apresentados fornecem evidências de que a definição dessas categorias é uma estratégia de fácil abordagem na rotina anatomopatológica e pode ser em curto prazo incorporada na prática clínica.

Os achados recentes mostram que a classificação molecular do CG pode fornecer a base teórica e experimental para o diagnóstico precoce, definição prognóstica, predição da eficácia terapêutica e principalmente para a estratificação de pacientes para tratamento individualizado. Terapias alvo como as que utilizam as drogas trastuzumab e ramucirumab (anticorpos anti-HER2 e anti-VEGFR-2, respectivamente), podem ser citadas como exemplos que buscam alcançar uma melhora no tratamento por meio de estratégias de terapia individualizadas.¹⁰⁴

Nesse sentido, a determinação dos tumores através dos dois parâmetros propostos neste estudo pode, do mesmo modo, abrir perspectivas para a individualização do tratamento do CG e melhor gestão da doença. No caso dos tumores EBV-positivo, além da expressão de PD-L1 demonstrada neste estudo, eles apresentam também frequente amplificação dos genes PD-L2 e JAK2, e alta prevalência de mutação de PIK3CA. Assim, a presença de EBV pode servir de indicação à terapia alvo com inibidores de PIK3/Akt (MK-2206 e BYL719), inibidores de PDL1 e PD-L2 (pembrolizumab e nivolumab) ou inibidores de JAK2 (AZD1480).^{92, 104} Já os

tumores de fenótipo MSI apresentam mutações ocasionais em PIK3/Akt, ERBB2, ERBB3 e EGFR, onde drogas como o pertuzumab e trastuzumab podem ser direcionadas à essa população. A imunoterapia destaca-se como opção de tratamento potencial principalmente nos tumores com instabilidade, pois estes mostram um número aumentado de neo-antígenos específicos de tumores derivados de genes hipermutados.^{92, 104}

Com relação à gestão da doença, o CG EBV-positivo demonstra ter resultados favoráveis, especialmente no que diz respeito aos carcinomas gástricos com estroma linfoide. No presente estudo, ainda que não significativa, os tumores EBV-positivos apresentam sobrevida superior comparado ao grupo controle. Além disso, no contexto do CG precoce, nenhum dos casos pT1 EBV-positivo apresentou LNM, característica também evidenciada por outros autores.⁶³ Portanto, estratégias terapêuticas mais conservadoras poderiam ser consideradas no CG precoce positivo para EBV, podendo auxiliar em condutas de ressecção endoscópica e aplicação de critérios expandidos, especialmente em pacientes com alto risco cirúrgico. Uma vez que o risco de LNM para o CG precoce é relatado em 13,3%, e a mortalidade cirurgia associada a pacientes de alto risco é em torno de 18,3%, o conhecimento dessas variáveis na população podem auxiliar na tomada de decisões.^{141, 142}

Estratégias semelhantes podem ser adotadas com relação aos tumores com MSI. Conforme observado neste estudo, os pacientes com CG MSI são mais velhos do que aqueles com tumores MSS. Isso deve ser levado em conta clinicamente, já que a maioria dos pacientes com idade mais avançada apresentam outras comorbidades, e poderia também o status de MSI auxiliar na opção por tratamento menos agressivo nesses casos (tais como linfadenectomia menos extensa ou ressecção endoscopia). Na presente série de CG, os pacientes com MSI apresentaram Charlson significativamente maior do que aqueles classificados como MSS, salientando a maior fragilidade do grupo.

Informações sobre sensibilidade à terapia nestes pacientes também podem ser úteis. Regimes quimioterápicos baseados no uso de 5-fluoracil (5-FU) são frequentemente usados no CG. Assim como evidenciado nos tumores de estômago deste estudo, no câncer colorretal os tumores com MSI são associados a melhor prognóstico, e não é indicada quimioterapia adjuvante com fluoropirimidina no estágio II da doença em pacientes com esse fenótipo.¹⁴³ Tumores gástricos com alterações genéticas no p53 e/ou MSI foram já relatados como significativamente mais resistentes à quimioterapia neoadjuvante.¹⁴⁴ Deste modo, o benefício ou não de uma indicação terapêutica poderia também ser avaliado nos subgrupos de CG no contexto pós-operatório.

Assim, a definição dos grupos EBV e MSI alcançadas nesse estudo abrem perspectivas para que novas classificações baseadas no perfil de expressão proteica possam ser propostas. A partir das características fornecidas pelos estudos moleculares, outros marcadores devem ser testados para distinguir os demais subgrupos. Pois embora algumas estratégias sejam sugeridas para aplicação prática,^{116, 117, 121} um refinamento dos painéis de biomarcadores para a estratificação do câncer gástrico ainda é necessário para aproximar os resultados encontrados aos subtipos moleculares de forma mais precisa.

Além da classificação molecular, as observações preliminares indicam que a resposta à imunoterapia estaria associada a níveis elevados de sinais imunológicos inibitórios, tais como PD-L1, CTLA-4 e ao maior número de linfócitos infiltrantes no tumores,¹⁴⁵ Assim, a determinação de um escore IHQ com base na contagem da população de linfócitos e outras células imunes no infiltrado poderia auxiliar na previsão de recorrência e sobrevida, adicionando valor prognóstico ao estadiamento TNM. Além disso, o escore IHQ pode funcionar como ferramenta preditiva útil para identificar pacientes com CG que poderiam se beneficiar de quimioterapia adjuvante ou candidatos à imunoterapia, assim como a classificação em EBV e MSI mostra-se capaz auxiliar na indicação terapêutica.^{145, 146}

Nesse cenário, é importante ressaltar que os resultados baseados em estudos moleculares não substituirão a avaliação clínica e patológica convencional para classificar o CG, mas sim servir como complemento aos atuais sistemas de classificação e estadiamento. Por conseguinte, os esforços futuros devem ser concentrados no desenvolvimento e validação de um painel imuno-proteico que determine os padrões histopatológicos e biológicos que corroborem para a aplicação do conhecimento genômico à prática clínica, tornando possível testar retrospectivamente e prospectivamente os pacientes com CG para a classe molecular a um custo razoável. Pois embora as técnicas geralmente utilizadas nos estudos genômicos sejam reconhecidas por sua sensibilidade, são técnicas que além do alto investimento já mencionado requerem integridade do DNA/RNA para realização das análises, o que pode não ser viável no contexto diagnóstico, já que a maioria dos espécimes tumorais disponíveis clinicamente é proveniente de tecidos parafinados.

6. CONCLUSÕES

Nas condições de realização da presente investigação, pode-se concluir que:

- A análise do perfil IHQ foi capaz de identificar dois subgrupos de câncer gástrico — EBV-positivo (10,5% dos casos) e MSI (27% dos casos) — semelhantes à classificação molecular.
- O câncer gástrico EBV-positivo e MSI apresentam características clinico-patológicas distintas e específicas, confirmando-se como duas entidades diferentes de tumores de estômago.
- Observou-se positividade para PD-L1 em 8,8% dos tumores, sendo o câncer gástrico EBV-positivo associado ao aumento da expressão de PD-L1.
- A presença de MSI associou-se a melhor SLD e SG nos pacientes com câncer gástrico em comparação com aqueles EBV-negativo/MSS, revelando-se como fator prognóstico independente para maior SLD.

7. REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359-86.
2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (RJ): INCA 2015.
3. Hamilton SR, Aaltonen LA. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. Lyon: IARC Press 2000;1ª ed.
4. Bosman TF, Carneiro F, Hruban RH, et al. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. International Agency for Research on cancer (IARC), Lyon: IARC Press 2010;4th ed.
5. Koifman S, Koifman RJ. Stomach cancer incidence in Brazil: an ecologic study with selected risk factors. *Cad Saude Publica* 1997;13 Suppl 1:85-92.
6. Ajani JA, In H, Sano T, et al. American Joint Committee on Cancer (AJCC). Cancer Staging Manual. 8th edition. Stomach. Springer 2017;17:203 - 220.
7. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014;513:202-9.
8. Garattini SK, Basile D, Cattaneo M, et al. Molecular classifications of gastric cancers: Novel insights and possible future applications. *World J Gastrointest Oncol* 2017;9:194-208.
9. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992;52:6735-40.
10. Perez RO, Jacob CE, D'Ottaviano FL, et al. Microsatellite instability in solitary and sporadic gastric cancer. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2004;59:279-85.
11. Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin* 2006;56:69-83.
12. Fuchs CS, Mayer RJ. Gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1995;333:32-41.
13. Correa P. Gastric neoplasia. *Curr Gastroenterol Rep* 2002;4:463-70.
14. Cesar AC, Silva AE, Tajara EH. [Genetics and environmental factors in gastric carcinogenesis]. *Arq Gastroenterol* 2002;39:253-9.
15. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. an attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64:31-49.

16. Vannella L, Lahner E, Annibale B. Risk for gastric neoplasias in patients with chronic atrophic gastritis: a critical reappraisal. *World J Gastroenterol* 2012;18:1279-85.
17. Carneiro F, Huntsman DG, Smyrk TC, et al. Model of the early development of diffuse gastric cancer in E-cadherin mutation carriers and its implications for patient screening. *J Pathol* 2004;203:681-7.
18. C PMSO, Kassab P, Lopasso FP, et al. Protective effect of ascorbic acid in experimental gastric cancer: reduction of oxidative stress. *World J Gastroenterol* 2003;9:446-8.
19. Roder DM. The epidemiology of gastric cancer. *Gastric Cancer* 2002;5 Suppl 1:5-11.
20. Kono S, Hirohata T. Nutrition and stomach cancer. *Cancer Causes Control* 1996;7:41-55.
21. Ramos MFKP. Fatores associados ao risco de desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico: estudo caso-controle [Dissertação]. . São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo 2016.
22. Fukayama M. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Pathol Int* 2010;60:337-50.
23. Nagini S. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World J Gastrointest Oncol* 2012;4:156-69.
24. Ernst PB, Peura DA, Crowe SE. The translation of *Helicobacter pylori* basic research to patient care. *Gastroenterology* 2006;130:188-206; quiz 212-3.
25. Peek RM, Jr., Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002;2:28-37.
26. Fukayama M, Hino R, Uozaki H. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma: virus-host interactions leading to carcinoma. *Cancer Sci* 2008;99:1726-33.
27. Ebert MP, Malfertheiner P. Review article: Pathogenesis of sporadic and familial gastric cancer--implications for clinical management and cancer prevention. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1059-66.
28. Smith MG, Hold GL, Tahara E, et al. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006;12:2979-90.
29. Thompson T. *Genética Médica*. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, RJ. 2002; 6ª edição.
30. Egger G, Liang G, Aparicio A, et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004;429:457-63.
31. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415-28.

32. Falchetti M, Saieva C, Lupi R, et al. Gastric cancer with high-level microsatellite instability: target gene mutations, clinicopathologic features, and long-term survival. *Hum Pathol* 2008;39:925-32.
33. Yasui W, Oue N, Aung PP, et al. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. *Gastric Cancer* 2005;8:86-94.
34. Garcia I, Vizoso F, Martin A, et al. Clinical significance of the epidermal growth factor receptor and HER2 receptor in resectable gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2003;10:234-41.
35. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376:687-97.
36. Tahara E. Molecular biology of gastric cancer. *World J Surg* 1995;19:484-8; discussion 489-90.
37. He XS, Su Q, Chen ZC, et al. Expression, deletion [was deletion] and mutation of p16 gene in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:515-21.
38. Hao Y, Zhang J, Yi C, et al. Abnormal change of p53 gene in gastric and precancerous lesions and APC gene deletion in gastric carcinoma and near tissues. *J Tongji Med Univ* 1997;17:75-8.
39. Tahara H, Kuniyasu H, Yokozaki H, et al. Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions. *Clin Cancer Res* 1995;1:1245-51.
40. Washington K. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Ann Surg Oncol* 2010;17:3077-9.
41. Zhang W. TCGA divides gastric cancer into four molecular subtypes: implications for individualized therapeutics. *Chin J Cancer* 2014;33:469-70.
42. Kawazoe A, Kuwata T, Kuboki Y, et al. Clinicopathological features of programmed death ligand 1 expression with tumor-infiltrating lymphocyte, mismatch repair, and Epstein-Barr virus status in a large cohort of gastric cancer patients. *Gastric Cancer* 2017;20:407-415.
43. Muro K, Chung HC, Shankaran V, et al. Pembrolizumab for patients with PD-L1-positive advanced gastric cancer (KEYNOTE-012): a multicentre, open-label, phase 1b trial. *The Lancet Oncology* 2016;17:717-726.
44. Raufi AG, Klempner SJ. Immunotherapy for advanced gastric and esophageal cancer: preclinical rationale and ongoing clinical investigations. *J Gastrointest Oncol* 2015;6:561-9.
45. Chang MS, Kim WH. Epstein-Barr virus in human malignancy: a special reference to Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma. *Cancer Res Treat* 2005;37:257-67.

46. Baumforth KR, Young LS, Flavell KJ, et al. The Epstein-Barr virus and its association with human cancers. *Mol Pathol* 1999;52:307-22.
47. Iizasa H, Nanbo A, Nishikawa J, et al. Epstein-Barr Virus (EBV)-associated gastric carcinoma. *Viruses* 2012;4:3420-39.
48. Tsao SW, Tsang CM, To KF, et al. The role of Epstein-Barr virus in epithelial malignancies. *J Pathol* 2015;235:323-33.
49. Thorley-Lawson DA, Hawkins JB, Tracy SI, et al. The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection. *Curr Opin Virol* 2013;3:227-32.
50. Shinozaki-Ushiku A, Kunita A, Fukayama M. Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer (review). *Int J Oncol* 2015;46:1421-34.
51. Akiba S, Koriyama C, Herrera-Goepfert R, et al. Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: epidemiological and clinicopathological features. *Cancer Sci* 2008;99:195-201.
52. Chesnokova LS, Nishimura SL, Hutt-Fletcher LM. Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins α v β 6 or α v β 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:20464-9.
53. Xiao J, Palefsky JM, Herrera R, et al. The Epstein-Barr virus BMRF-2 protein facilitates virus attachment to oral epithelial cells. *Virology* 2008;370:430-42.
54. Cheng N, Hui DY, Liu Y, et al. Is gastric lymphoepithelioma-like carcinoma a special subtype of EBV-associated gastric carcinoma? New insight based on clinicopathological features and EBV genome polymorphisms. *Gastric Cancer* 2015;18:246-55.
55. Ramos MFKP, Pereira MA, Dias AR, et al. Lymphoepithelioma-like gastric carcinoma: clinicopathological characteristics and infection status. *J Surg Res* 2017;210:159-168.
56. Gulley ML. Genomic assays for Epstein-Barr virus-positive gastric adenocarcinoma. *Exp Mol Med* 2015;47:e134.
57. Kang GH, Lee S, Kim WH, et al. Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma demonstrates frequent aberrant methylation of multiple genes and constitutes CpG island methylator phenotype-positive gastric carcinoma. *Am J Pathol* 2002;160:787-94.
58. Drotar ME, Silva S, Barone E, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 and Myc cooperate in lymphomagenesis. *Int J Cancer* 2003;106:388-95.
59. Lee JH, Kim SH, Han SH, et al. Clinicopathological and molecular characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:354-65.

60. Hayashi K, Teramoto N, Akagi T, et al. In situ detection of Epstein-Barr virus in the gastric glands with intestinal metaplasia. *Am J Gastroenterol* 1996;91:1481.
61. Fukayama M, Ushiku T. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Pathol Res Pract* 2011;207:529-37.
62. Murphy G, Pfeiffer R, Camargo MC, et al. Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location. *Gastroenterology* 2009;137:824-33.
63. Lee JY, Kim KM, Min BH, et al. Epstein-Barr virus-associated lymphoepithelioma-like early gastric carcinomas and endoscopic submucosal dissection: case series. *World J Gastroenterol* 2014;20:1365-70.
64. Nakamura S, Ueki T, Yao T, et al. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma with lymphoid stroma. Special reference to its detection by the polymerase chain reaction and in situ hybridization in 99 tumors, including a morphologic analysis. *Cancer* 1994;73:2239-49.
65. Kim SY, Park C, Kim HJ, et al. Deregulation of immune response genes in patients with Epstein-Barr virus-associated gastric cancer and outcomes. *Gastroenterology* 2015;148:137-147 e9.
66. Kuzushima K, Nakamura S, Nakamura T, et al. Increased frequency of antigen-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes infiltrating an Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *J Clin Invest* 1999;104:163-71.
67. Jacome AA, Lima EM, Kazzi AI, et al. Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: a distinct molecular subtype of the disease? *Rev Soc Bras Med Trop* 2016;49:150-7.
68. Loeb LA. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 1994;54:5059-63.
69. Zhu L, Li Z, Wang Y, et al. Microsatellite instability and survival in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Mol Clin Oncol* 2015;3:699-705.
70. Halling KC, Harper J, Moskaluk CA, et al. Origin of Microsatellite Instability in Gastric Cancer. *The American Journal of Pathology* 1999;155:205-211.
71. Waki T, Tamura G, Tsuchiya T, et al. Promoter methylation status of E-cadherin, hMLH1, and p16 genes in nonneoplastic gastric epithelia. *Am J Pathol* 2002;161:399-403.
72. Seo HM, Chang YS, Joo SH, et al. Clinicopathologic characteristics and outcomes of gastric cancers with the MSI-H phenotype. *J Surg Oncol* 2009;99:143-7.
73. Polom K, Marano L, Marrelli D, et al. Meta-analysis of microsatellite instability in relation to clinicopathological characteristics and overall survival in gastric cancer. *Br J Surg* 2017.

74. Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, et al. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology* 2008;134:988-97.
75. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000;192:1027-34.
76. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008;26:677-704.
77. Taube JM, Anders RA, Young GD, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 2012;4:127ra37.
78. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12:252-64.
79. Tran PN, Sarkissian S, Chao J, et al. PD-1 and PD-L1 as emerging therapeutic targets in gastric cancer: current evidence. *Gastrointest Cancer* 2017;7:1-11.
80. Wu P, Wu D, Li L, et al. PD-L1 and Survival in Solid Tumors: A Meta-Analysis. *PLoS One* 2015;10:e0131403.
81. Liu YX, Wang XS, Wang YF, et al. Prognostic significance of PD-L1 expression in patients with gastric cancer in East Asia: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* 2016;9:2649-54.
82. Jin Z, Yoon HH. The promise of PD-1 inhibitors in gastro-esophageal cancers: microsatellite instability vs. PD-L1. *J Gastrointest Oncol* 2016;7:771-788.
83. Böger C, Behrens HM, Mathiak M, et al. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. *Oncotarget* 2016;26;7(17):24269-83.
84. Eto S, Yoshikawa K, Nishi M, et al. Programmed cell death protein 1 expression is an independent prognostic factor in gastric cancer after curative resection. *Gastric Cancer* 2016;19:466-71.
85. Oki E, Okano S, Saeki H, et al. Protein Expression of Programmed Death 1 Ligand 1 and HER2 in Gastric Carcinoma. *Oncology* 2017.
86. Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev* 2011;241:260-8.
87. Kim JW, Nam KH, Ahn SH, et al. Prognostic implications of immunosuppressive protein expression in tumors as well as immune cell infiltration within the tumor microenvironment in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2016;19:42-52.
88. Derks S, Liao X, Chiaravalli AM, et al. Abundant PD-L1 expression in Epstein-Barr Virus-infected gastric cancers. *Oncotarget* 2016;31;7(22):32925-32.

89. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 2015;372:2509-20.
90. Mandai M, Hamanishi J, Abiko K, et al. Dual Faces of IFN γ in Cancer Progression: A Role of PD-L1 Induction in the Determination of Pro- and Antitumor Immunity. *Clin Cancer Res* 2016;22:2329-34.
91. Green MR, Rodig S, Juszczynski P, et al. Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2012;18:1611-8.
92. Fontana E, Smyth EC. Novel targets in the treatment of advanced gastric cancer: a perspective review. *Ther Adv Med Oncol* 2016;8:113-25.
93. Fuchs CS, Doi T, Jang RW-J, et al. KEYNOTE-059 cohort 1: Efficacy and safety of pembrolizumab (pembro) monotherapy in patients with previously treated advanced gastric cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2017;35:4003-4003.
94. Bilgin B, Sendur MA, Bulent Akinci M, et al. Targeting the PD-1 pathway: a new hope for gastrointestinal cancers. *Curr Med Res Opin* 2017;33:749-759.
95. Davis PA, Sano T. The difference in gastric cancer between Japan, USA and Europe: what are the facts? what are the suggestions? *Crit Rev Oncol Hematol* 2001;40:77-94.
96. Noguchi Y, Yoshikawa T, Tsuburaya A, et al. Is gastric carcinoma different between Japan and the United States? *Cancer* 2000;89:2237-46.
97. Japanese Gastric Cancer A. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2014 (ver. 4). *Gastric Cancer* 2017;20:1-19.
98. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, et al. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987;40:373-83.
99. Doyle DJ, Garmon EH. American Society of Anesthesiologists Classification (ASA Class). StatPearls. Treasure Island FL: StatPearls Publishing LLC., 2017.
100. Dindo D, Demartines N, Clavien P-A. Classification of Surgical Complications: A New Proposal With Evaluation in a Cohort of 6336 Patients and Results of a Survey. *Annals of Surgery* 2004;240:205-213.
101. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med* 2015;21:449-56.
102. Kuboki Y, Yamashita S, Niwa T, et al. Comprehensive analyses using next-generation sequencing and immunohistochemistry enable precise treatment in advanced gastric cancer. *Ann Oncol* 2016;27:127-33.

103. Setia N, Agoston AT, Han HS, et al. A protein and mRNA expression-based classification of gastric cancer. *Mod Pathol* 2016;29:772-84.
104. Sunakawa Y, Lenz HJ. Molecular classification of gastric adenocarcinoma: translating new insights from the cancer genome atlas research network. *Curr Treat Options Oncol* 2015;16:17.
105. Camargo MC, Koriyama C, Matsuo K, et al. Case-case comparison of smoking and alcohol risk associations with Epstein-Barr virus-positive gastric cancer. *Int J Cancer* 2014;134:948-53.
106. Koriyama C, Akiba S, Minakami Y, et al. Environmental factors related to Epstein-Barr virus-associated gastric cancer in Japan. *J Exp Clin Cancer Res* 2005;24:547-53.
107. Grogg KL, Lohse CM, Pankratz VS, et al. Lymphocyte-rich gastric cancer: associations with Epstein-Barr virus, microsatellite instability, histology, and survival. *Mod Pathol* 2003;16:641-51.
108. Truong CD, Feng W, Li W, et al. Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: a study of 235 cases at a comprehensive cancer center in U.S.A. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28:14.
109. Ma C, Patel K, Singhi AD, et al. Programmed Death-Ligand 1 Expression Is Common in Gastric Cancer Associated With Epstein-Barr Virus or Microsatellite Instability. *Am J Surg Pathol* 2016;40:1496-1506.
110. Ma J, Li J, Hao Y, et al. Differentiated tumor immune microenvironment of Epstein-Barr virus-associated and negative gastric cancer: implication in prognosis and immunotherapy. *Oncotarget* 2017;8:67094-67103.
111. Ramos MFKP, Pereira MA, Dias AR, et al. Lymphoepithelioma-like gastric carcinoma: clinicopathological characteristics and infection status. *J Surg Res.* 2017;210:159-168.
112. Ahn S, Lee SJ, Kim Y, et al. High-throughput Protein and mRNA Expression-based Classification of Gastric Cancers Can Identify Clinically Distinct Subtypes, Concordant With Recent Molecular Classifications. *Am J Surg Pathol* 2017;41:106-115.
113. Song HJ, Kim KM. Pathology of epstein-barr virus-associated gastric carcinoma and its relationship to prognosis. *Gut Liver* 2011;5:143-8.
114. Song HJ, Srivastava A, Lee J, et al. Host inflammatory response predicts survival of patients with Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2010;139:84-92 e2.
115. Liu X, Liu J, Qiu H, et al. Prognostic significance of Epstein-Barr virus infection in gastric cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer* 2015;15:782.

116. Kim HS, Shin SJ, Beom SH, et al. Comprehensive expression profiles of gastric cancer molecular subtypes by immunohistochemistry: implications for individualized therapy. *Oncotarget* 2016;7 (28):44608-44620.
117. Birkman EM, Mansuri N, Kurki S, et al. Gastric cancer: immunohistochemical classification of molecular subtypes and their association with clinicopathological characteristics. *Virchows Arch* 2017.
118. Nakajima T, Akiyama Y, Shiraishi J, et al. Age-related hypermethylation of the hMLH1 promoter in gastric cancers. *Int J Cancer* 2001;94:208-11.
119. Bae YS, Kim H, Noh SH, et al. Usefulness of Immunohistochemistry for Microsatellite Instability Screening in Gastric Cancer. *Gut Liver* 2015;9:629-35.
120. Shokal U, Sharma PC. Implication of microsatellite instability in human gastric cancers. *Indian J Med Res* 2012;135:599-613.
121. Gonzalez RS, Messing S, Tu X, et al. Immunohistochemistry as a surrogate for molecular subtyping of gastric adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2016;56:16-21.
122. Lee HS, Choi SI, Lee HK, et al. Distinct clinical features and outcomes of gastric cancers with microsatellite instability. *Mod Pathol* 2002;15:632-40.
123. Gu L, Chen M, Guo D, et al. PD-L1 and gastric cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2017;12:e0182692.
124. Ritprajak P, Azuma M. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2015;51:221-8.
125. Teng MW, Ngiew SF, Ribas A, et al. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res* 2015;75:2139-45.
126. Kim KJ, Lee KS, Cho HJ, et al. Prognostic implications of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells and CD8+ cytotoxic T cells in microsatellite-unstable gastric cancers. *Hum Pathol* 2014;45:285-93.
127. Xu F, Feng G, Zhao H, et al. Clinicopathologic Significance and Prognostic Value of B7 Homolog 1 in Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)* 2015;94:e1911.
128. Fang W, Chen Y, Sheng J, et al. Association between PD-L1 Expression on Tumour-Infiltrating Lymphocytes and Overall Survival in Patients with Gastric Cancer. *J Cancer* 2017;8:1579-1585.
129. Gao Y, Li S, Xu D, et al. Prognostic value of programmed death-1, programmed death-ligand 1, programmed death-ligand 2 expression, and CD8(+) T cell density in primary tumors and metastatic lymph nodes from patients with stage T1-4N+M0 gastric adenocarcinoma. *Chin J Cancer* 2017;36:61.

130. Ilyas M, Grabsch H, Ellis IO, et al. Guidelines and considerations for conducting experiments using tissue microarrays. *Histopathology* 2013;62:827-39.
131. Shah MA, Khanin R, Tang L, et al. Molecular classification of gastric cancer: a new paradigm. *Clin Cancer Res* 2011;17:2693-701.
132. Oda K, Koda K, Takiguchi N, et al. Detection of Epstein-Barr virus in gastric carcinoma cells and surrounding lymphocytes. *Gastric Cancer* 2003;6:173-8.
133. Watson N, Grieu F, Morris M, et al. Heterogeneous staining for mismatch repair proteins during population-based prescreening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2007;9:472-8.
134. Velho S, Fernandes MS, Leite M, et al. Causes and consequences of microsatellite instability in gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2014;20:16433-42.
135. Choi YY, Bae JM, An JY, et al. Is microsatellite instability a prognostic marker in gastric cancer? A systematic review with meta-analysis. *J Surg Oncol* 2014;110:129-35.
136. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248-57.
137. Derks S, Nason KS, Liao X, et al. Epithelial PD-L2 Expression Marks Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma. *Cancer Immunol Res* 2015;3:1123-1129.
138. Dias AR, Pereira MA, Mello ES, et al. Carnoy's solution increases the number of examined lymph nodes following gastrectomy for adenocarcinoma: a randomized trial. *Gastric Cancer* 2016;19:136-42.
139. Pereira MA, Dias AR, Faraj SF, et al. Carnoy's solution is an adequate tissue fixative for routine surgical pathology, preserving cell morphology and molecular integrity. *Histopathology* 2015;66:388-97.
140. Pereira MA, Ramos MFKP, Dias AR, et al. Detection of occult lymph node tumor cells in node-negative gastric cancer patients. *Arq Bras Cir Dig* 2017;30:30-34.
141. Pereira MA, Ramos MFKP, Dias AR, et al. Risk Factors for Lymph Node Metastasis in Western Early Gastric Cancer After Optimal Surgical Treatment. *J Gastrointest Surg* 2017.
142. Ramos MK, Pereira M, Dias AR, et al. Outcome of Gastric Cancer Patients Submitted to D1 Lymph Node Dissection Due to Unfavorable Medical Conditions. *Gastroenterology*;152:S1247.
143. Varghese A. Chemotherapy for Stage II Colon Cancer. *Clin Colon Rectal Surg* 2015;28:256-61.

144. Yashiro M, Inoue T, Nishioka N, et al. Allelic imbalance at p53 and microsatellite instability are predictive markers for resistance to chemotherapy in gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2009;16:2926-35.
145. Jiang Y, Zhang Q, Hu Y, et al. ImmunoScore Signature: A Prognostic and Predictive Tool in Gastric Cancer. *Ann Surg* 2016.
146. Wen T, Wang Z, Li Y, et al. A Four-Factor Immunoscore System That Predicts Clinical Outcome for Stage II/III Gastric Cancer. *Cancer Immunol Res* 2017;5:524-534.

ANEXOS

A. Aprovação do projeto no Núcleo de Pesquisa

Aprovação do projeto “Caracterização da infecção por *Helicobacter pylori*, vírus *Epstein-Barr* e perfil gênico-proteico dos adenocarcinomas gástricos”.

<p>INSTITUTO DO CÂNCER DO ESTADO DE SÃO PAULO HISTÓRIA ANOS DE EXCELÊNCIA</p>	<p>FACULDADE DE MEDICINA</p>
São Paulo, 27 de fevereiro de 2015	
Registro: NP 771/2015	
Ref. Solicitação de execução de estudo: Caracterização da infecção por <i>Helicobacter Pylori</i>, vírus <i>Epstein-Barr</i> e perfil da expressão gênico-proteica nos adenocarcinomas gástricos	
Pesquisador responsável: Prof. Ulysses Ribeiro Junior / Dr. Marcus Fernando Kodama P. Ramos	
CONSIDERAÇÕES	
Trata-se de uma avaliação retrospectiva entre os pacientes submetidos à gastrectomia por adenocarcinoma gástrico na instituição no período de 2009 e 2014 será realizada através métodos imuno-histoquímicos e pela técnica de hibridização in situ (HIS) a partir da construção de microarrays de tecido com amostras de tumor viável obtidas de blocos de parafina de cada pacientes.	
O objetivo do estudo é determinar a frequência de infecção por HP e EBV nos pacientes com CG do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) e caracterizar o perfil da população para as variáveis genéticas HER-2 e MMR, analisando-os juntamente com parâmetros clínico-patológicos, incluindo idade, sexo, tipo de tumor, nível de invasão tumoral, status linfonodal, estágio patológico do tumor, caracterização do perfil de mucinas e repercussão clínica.	
OBRIGAÇÕES DO PESQUISADOR	
Antes do início dos procedimentos relacionados ao estudo:	
<ul style="list-style-type: none"> • Iniciar as atividades do estudo somente após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da <u>FMUSP</u> para execução no ICESP segundo a Res. 466/12; • Após aprovação do CEP, fornecer cópia da Carta de Aprovação e Relatório Final com ciência do CEP ao NP- ICESP; • Enviar Publicação dos resultados do estudo; 	
Informamos que sua solicitação foi DEFERIDA.	
Atenciosamente,
<hr/> <p>Prof. Dr. Paulo M. Hoff Diretor Geral ICESP</p>

CIÊNCIA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 06 de Maio de 2015, **TOMOU CIÊNCIA do(s) documento(s)** abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº 102/15, intitulado: "Caracterização da infecção por *Helicobacter pylori*, vírus Epstein-Barr e perfil da expressão gênico-proteica nos adenocarcinomas gástricos" apresentado pelo Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

•MM 0440/2015 - Inclusão da Pesquisadora Marina Alessandra Pereira

Pesquisador (a) Responsável: Ulysses Ribeiro Junior

CEP-FMUSP, 06 de Maio de 2015

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

B. Aprovação do projeto de Banco de Dados no Núcleo de Pesquisa

Aprovação do projeto “Banco de dados de pacientes do Serviço de Cirurgia Oncológica do aparelho Digestivo do ICESP-HCFMUSP”

**INSTITUTO DO
CÂNCER
DO ESTADO DE
SÃO PAULO**

FACULDADE DE MEDICINA

São Paulo, 05 de agosto de 2016.

Registro: NP 993/16

Ref. Solicitação de execução de estudo: **Banco de dados de pacientes do Serviço de Cirurgia Oncológica do aparelho Digestivo do ICESP-HCFMUSP**

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Ulysses Riberio Junior
 Pesquisador Executante: Dr. Marcus Fernando Kodama
 Dra. Marina Alessandra Pereira

CONSIDERAÇÕES

Trata-se de um estudo retrospectivo com a finalidade de uma pesquisa científica regular. O projeto visa criar um instrumento de registros de dados completos e padronizados para auxiliar futuros projetos de pesquisa no Serviço de Cirurgia Oncológica do Aparelho Digestivo do ICESP. Os pacientes atendidos no ICESP terão suas informações inseridas no Banco de Dados. Os dados serão coletados a partir de prontuário eletrônico e laudos de exames, não havendo necessidade de coleta de informações direta com o paciente.

RESPONSABILIDADES DO PESQUISADOR
 Antes do início das atividades relacionadas ao estudo:

- Apresentar a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP para execução no ICESP conforme a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde;
- Enviar relatório final do estudo. Projetos sem informações por mais de 1 ano serão cancelados automaticamente e impedirá a submissão de novos projetos pelos investigadores;
- Enviar resultados do projeto (publicações, defesa de tese, apresentação em congressos e outros);

Informamos que sua solicitação foi DEFERIDA.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paulo M. Hoff
 Diretor Geral

Prof. Dr. Paulo M. Hoff
 Diretor Geral
 ICESP

Versão 20 de maio de 2015

HCFMUSP
FACULDADE DE MEDICINA

FACULDADE DE MEDICINA

MEDICINA

**GOVERNO DO ESTADO
SÃO PAULO**
Secretaria de Saúde

Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP - 01246-000 - Tel. 11 3893 2000 - www.icesp.org.br

C. Parecer do CEP – Plataforma Brasil

Parecer do projeto “Caracterização da infecção por *Helicobacter pylori*, vírus *Epstein-Barr* e perfil gênico-proteico dos adenocarcinomas gástricos” no CEP.

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div> USP - FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FMUSP </div> <div> </div> </div>								
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
<p>DADOS DA EMENDA</p> <p>Título da Pesquisa: Caracterização da infecção por <i>Helicobacter pylori</i>, vírus Epstein-Barr e perfil da expressão gênico-proteica nos adenocarcinomas gástricos</p> <p>Pesquisador: Ulysses Ribeiro Junior</p> <p>Área Temática:</p> <p>Versão: 3</p> <p>CAAE: 43453515.6.0000.0065</p> <p>Instituição Proponente: FUNDACAO FACULDADE DE MEDICINA</p> <p>Patrocinador Principal: Financiamento Próprio</p> <p>DADOS DO PARECER</p> <p>Número do Parecer: 2.370.921</p> <p>Apresentação do Projeto: Projeto sem alteração. Emenda para inclusao do pesquisador Marcus Fernando Pertille e Marina Pereira</p> <p>Objetivo da Pesquisa: sem modificação</p> <p>Avaliação dos Riscos e Benefícios: sem modificação</p> <p>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: sem modificação</p> <p>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: sem modificação</p> <p>Recomendações: sem modificação</p> <p>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: aprovada a inclusão de 2 pesquisadores</p> <p>Considerações Finais a critério do CEP:</p>								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2">Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36</td> </tr> <tr> <td>Bairro: PACAEMBU</td> <td>CEP: 01.246-903</td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: SÃO PAULO</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (11)3893-4401</td> <td>E-mail: cep.fm@usp.br</td> </tr> </table>	Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36		Bairro: PACAEMBU	CEP: 01.246-903	UF: SP	Município: SÃO PAULO	Telefone: (11)3893-4401	E-mail: cep.fm@usp.br
Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36								
Bairro: PACAEMBU	CEP: 01.246-903							
UF: SP	Município: SÃO PAULO							
Telefone: (11)3893-4401	E-mail: cep.fm@usp.br							

**USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP**

Continuação do Parecer: 2.370.921

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_974479 E2.pdf	21/09/2017 14:05:29		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	semalteracaoTCLE.pdf	21/09/2017 14:03:01	Evelise Pelegrinelli Zaidan	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	semalteracaoprojeto.pdf	21/09/2017 14:02:49	Evelise Pelegrinelli Zaidan	Aceito
Outros	Memo883_17_Pesquisadores.pdf	21/09/2017 13:59:08	Evelise Pelegrinelli Zaidan	Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto.JPG	25/03/2015 00:04:15		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Novembro de 2017

Assinado por:
Antonio de Padua Mansur
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU CEP: 01.246-903
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

D. World Congress of Gastroenterology - WCOG at ACG2017

Apresentação oral: *Best of Original Latin American Research plenary session* - Outubro 13 a 18, 2017. *Orange County Convention Center*. Orlando, Florida.

"Clinicopathological Characteristics and Prognostic Value of Epstein-Barr Virus-associated Gastric Cancer, Microsatellite Instability and PD-L1 Immunoexpression". *American Journal of Gastroenterology* (Volume 112, Issue S1 - October 2017) - pag S665, abstract n°1217.

Clinicopathological Characteristics and Prognostic Value of Epstein-Barr Virus-associated Gastric Cancer, Microsatellite Instability and PD-L1 Immunoexpression

Marina Alessandra Pereira, MSc¹, Marcus Fernando Kodama Pertille Ramos, MD, MSc¹, André Roncon Dias, MD, PhD¹, Sheila Friedrich Faraj, MD¹, Osmar Kenji Yagi, MD, PhD¹, Bruno Zilberstein, MD, PhD¹, Ivan Cecconello, MD, PhD¹, Evandro Sobroza de Mello, MD, PhD², Ulysses Ribeiro, Jr., MD, PhD¹. ¹University of Sao Paulo School of Medicine, Sao Paulo, Brazil; ²University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Introduction: Based on gene expression profile studies, gastric cancer (GC) has recently been categorized into molecular subtypes, which include Epstein-Barr (EBV)-positive and microsatellite instable (MSI) tumors. This tumoral characterization, besides providing more prognostic information, allows the identification of molecular pathways and potential therapeutic targets. In this context, the identification of biomarkers including PD-L1 may be useful for patient stratification and development of personalized therapy.

Objective: to evaluate the frequency of EBV, MSI and PD-L1 immunoexpression in GC and its relationship to clinicopathological characteristics and prognosis.

Methods: We analyzed specimens from 287 patients with GC who underwent gastrectomy with D2 lymphadenectomy using tissue microarray technique. DNA mismatch repair proteins (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) and PD-L1 expression in tumor cells (PD-L1^{TU}), and in inflammatory infiltrated cells were assessed by immunohistochemistry. EBV was detected by in situ hybridization.

Results: EBV(+) and MSI were identified in 10.5% and 27% of GC, respectively. Clinicopathological characteristics associated to EBV infection were: male (p=0.032), proximal location (p < 0.001), undetermined/intestinal Lauren type (p < 0.001), poorly differentiated histology (p=0.043) and severe inflammatory infiltration (p < 0.001). MSI-tumors were associated to older age (p=0.002), distal location (p=0.004), lower frequency of lymph node metastasis (LNM) (p=0.024) and lower stage (p=0.020). PD-L1(+) was seen in 8.8% of cases, with predominance of PD-L1^{TU} (6.3%). The PD-L1^{TU}(+) were associated to indeterminate Lauren type (p < 0.001), poorly differentiated histology (p=0.015) and severe inflammatory infiltration (p=0.010). A robust PD-L1 expression was also observed in EBV(+) GC (p < 0.001) patients. Among PD-L1(+) GC, 50% had EBV(+) and 27% MSI. According to the survival analysis, MSI GC had longer disease-free survival (DFS) (p=0.013). Considering only patients with LNM, GC PD-L1^{TU}(+) had DFS significantly worse than PD-L1(-) (p=0.049).

Conclusion: The IHC profile analysis was able to identify subgroups of GC with different characteristics. MSI phenotype was related to longer SLD, confirming its use as a prognostic marker in GC. In addition, EBV(+) and MSI GC together accounts for nearly 70% of PD-L1(+) tumors. This data suggest that subgroup recognition may alter the indication of targeted therapies and improve the prognostic value of current staging systems.

E. XIII Congresso Brasileiro de Cirurgia Oncológica, 2017 (CBCO)

1º Lugar: Melhor trabalho científico – Tema livre. Apresentação Oral.

Título: “Avaliação da infecção pelo vírus *Epstein-Barr*, instabilidade de microsatélite e expressão de PD-L1 nos adenocarcinomas gástricos: aspectos clínico-patológicos e prognósticos”.

F. Congresso: XVI SBAD 2017 - Semana Brasileira do Aparelho Digestivo

1º Lugar: Trabalho Premiado CBCD - Prêmio especial Colégio Brasileiro de Cirurgia Digestiva - SBAD 2017. Apresentação Oral.

Título: “Vírus *Epstein-Barr*, instabilidade de microssatélite e expressão de PD-L1 nos adenocarcinomas gástricos: aspectos clínico-patológicos e prognósticos”.

G. Apresentação na Reunião Geral das Disciplinas de Cirurgia do Aparelho Digestivo.

Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

H. SSO 2018 - Annual Cancer Symposium - Chicago

Apresentação: “*Epstein-Barr Virus, Microsatellite Instability and PD-L1 Expression in Gastric Adenocarcinoma: Clinicopathological and Prognostic Aspects*”.

SS2018 ANNUAL CANCER SYMPOSIUM
March 21-24 | Chicago, IL

THE SPECTRUM OF INNOVATION AND APPLICATION

THE EXCEPTIONAL SURGICAL ONCOLOGY EXPERIENCE

As a result of SSO's partnership with various international societies and a successful launch in 2016, SSO 2018 will feature the Global Partner Posters section in the hall, where top abstracts from six worldwide events over the past year will be highlighted. These posters are located in the front section of posters in **Exhibit Hall D1** with separate signage.

See page 79 for full poster information and hours.

NOT FOR CREDIT

Highlighted Posters From the Brazilian Society of Surgical Oncology

GP1 Epstein-Barr Virus, Microsatellite Instability and PD-L1 Expression in Gastric Adenocarcinoma: Clinicopathological and Prognostic Aspects

I. Artigo publicado

Artigo publicado no “Journal of Surgical Oncology”.

- Submetido em: 25 de Outubro de 2017.
- Aceito em: 28 de Janeiro de 2018.
- Aceite final em: 6 de Fevereiro de 2018.

Journal of Surgical Oncology

Clinicopathological and prognostic features of Epstein-Barr virus infection, microsatellite instability and PD-L1 expression in gastric cancer

DOI:10.1002/jso.25022

Clinicopathological and prognostic features of Epstein-Barr virus infection, microsatellite instability, and PD-L1 expression in gastric cancer

Marina A. Pereira MSc | Marcus F.K.P. Ramos MD, MS | Sheila F. Faraj MD |
Andre R. Dias MD, PhD | Osmar K. Yagi MD, PhD | Bruno Zilberstein MD, PhD |
Ivan Cecconello MD, PhD | Venancio A.F. Alves MD, PhD |
Evandro S. de Mello MD, PhD | Ulysses Ribeiro Jr MD, PhD

Cancer Institute, University of Sao Paulo,
Sao Paulo, Brazil

Correspondence

Marina A. Pereira, Avenida Doutor Arnaldo,
251 – Cancer Institute, Sao Paulo 01246-000,
Brazil.
Email address: ma.ap@hotmail.com;
marina.pereira@hc.fm.usp.br

Background and Objectives: Gastric cancer (GC) has recently been categorized in molecular subtypes, which include Epstein-Barr (EBV)-positive and microsatellite instability (MSI) tumors. This distinction may provide prognostic information and identifies therapeutic targets. The aim of this study was to evaluate EBV, MSI, and PD-L1 immunoexpression in GC and its relationship with clinicopathological characteristics and patient's prognosis.

Methods: We evaluated 287 GC patients who underwent D2-gastrectomy through immunohistochemistry for DNA mismatch repair proteins and PD-L1, and in situ hybridization for EBV detection utilizing tissue microarray.

Results: EBV-positive and MSI were identified in 10.5% and 27% of the GCs, respectively. EBV positivity was associated to male gender ($P = 0.032$), proximal location ($P < 0.001$), undetermined Lauren type ($P < 0.001$), poorly differentiated histology ($P = 0.043$) and severe inflammatory infiltrate ($P < 0.001$). MSI-tumors were associated to older age ($P = 0.002$), subtotal gastrectomy ($P = 0.004$), pN0 ($P = 0.024$) and earlier TNM stage ($P = 0.020$). PD-L1-positive was seen in 8.8% of cases, with predominant expression in EBV-positive GC ($P < 0.001$). MSI was associated to better survival outcomes.

Conclusion: EBV-positive GCs had increased PD-L1 expression, while MSI GC had better survival outcome. EBV and MSI subgroups are distinct GC entities, their recognition is feasible by conventional techniques, and it may help individualize follow-up and guide adjuvant therapy.

KEYWORDS

Epstein-Barr virus infection, microsatellite instability, molecular targeted therapy, programmed death-ligand 1, stomach neoplasms

1 | INTRODUCTION

Gastric cancer (GC) is the 4th most common cancer and the 2nd leading cause of cancer-related death worldwide.¹ In the current clinical practice, histological features including Lauren histological type and TNM stage system are used to predict prognosis and survival.² However, these parameters are insufficient to predict disease progression in an individual basis. Also, they do not reflect the heterogeneity of gastric tumors, or even assist in the development of targeted therapies. Thus, identifying subtypes of GC according to molecular characteristics is one of the current goals to better understand its heterogeneity and improve clinical outcome.³

Based on gene expression profile studies, GC was categorized into four molecular subtypes: Epstein-Barr virus (EBV)-positive tumors; microsatellite instability (MSI) tumors; genomically stable (GS) tumors; and chromosomal-unstable (CIN) tumors.⁴ In addition to defining subgroups biologically more homogeneous, the molecular classification has potential prognostic and therapeutic implications, since it may identify possible biomarkers and therapeutic targets of each subtype, particularly through the stratification according to EBV and MSI status.^{5,6}

Currently, programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in tumor cells has been validated as a predictive marker for tumor response to anti-PD-1 or PD-L1 immunotherapy in different malignancies, including GC. According to The Cancer Genome Atlas (TCGA) study and recent trials, EBV and MSI GC subgroups may benefit from therapy with PD-1/PD-L1 antibodies.^{4,7,8} However, the frequency and prognostic value of PD-L1 expression in GC remain controversial.

Although these studies represent a significant progress in the definition of GC from a biological perspective,⁹ the spread of this classification is still limited by the lack of clinical scope. Also, the genomic technology for a complete molecular classification is not currently cost effective, preventing the widespread use of this diagnostic strategy into clinical practice.

Thus, the aim of this study was to investigate the EBV infection by *in situ* hybridization (ISH), and MSI status and PD-L1 expression using immunohistochemistry (IHC) in a western cohort of surgically treated GC patients. Additionally, we analyzed the clinicopathological and prognostic factors associated with IHC profiles.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients

We reviewed all gastric adenocarcinoma patients who underwent potentially curative gastrectomy with lymphadenectomy at Instituto do Cancer do Estado de São Paulo—Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICESP-HCFMUSP) between 2009 and 2016 from a prospective collected medical database. Inclusion criteria were: (1) gastric adenocarcinoma; (2) D2 lymphadenectomy; (3) R0 resection; and (4) formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPE) blocks available for analysis. Gastric stump

tumors, palliative resections and metastatic patients were not included.

All patients underwent total or subtotal gastrectomy with D2 lymph node (LN) dissection based on the guidelines of the Japanese Gastric Cancer Association.¹⁰ Surgical specimens were fixed in 10% buffered formalin or Carnoy's Solution^{11,12} and were evaluated according to the College of American Pathologists protocol.¹³ IHC with cytokeratin were performed in some cases to detect lymph node micrometastases.¹⁴ Tumor stage was defined according to the 7th edition of the TNM as proposed by the International Union Against Cancer (UICC).²

Clinical outcomes were overall survival (OS) and disease-free survival (DFS). Postoperative follow-up was performed on a quarterly basis in the first year and every 6 months in the following years. Clinical physical examinations and hematological tests were performed in all outpatients' visits. Imaging and upper gastrointestinal endoscopy were selectively performed. Absence in medical appointment for more than 12 months was considered as loss of follow-up.

The study was approved by the hospital ethics committee (NP771/2015) and is registered in the "Plataforma Brasil" (a National Research Council) under the CAAE number 43453515.6.0000.0065. Informed consent of patients was waived because of the retrospective nature.

2.2 | Tissue microarray

All hematoxylin and eosin (HE)-stained slides were reviewed and representative tumor tissue samples were selected for each case. For tissue microarray (TMA) construction, the corresponding areas were punched out from individual FFPE tumor blocks and arrayed in a precision mechanized system (Beecher Instruments, Silver Springs, MD). A total of nine TMAs were constructed with three tumor and two adjacent non-tumoral mucosa tissue cores (2 mm in diameter) from each patient. TMA blocks were sectioned at 4 μ m thick and histological sections were submitted to HE staining, IHC, and ISH.

2.3 | Immunohistochemistry

The IHC reactions to determine the MSI status were performed with Ventana BenchMark ULTRA automated staining system according to the manufacturer's instructions using monoclonal antibodies against the four mismatch repair (MMR) proteins: anti-MLH1 (clone M1–Ventana, Ref. 790–4535), anti-MSH2 (clone G219–1129–Cellmarque, Ref. 760–4265), anti-MSH6 (clone 44–Ventana, Ref. 790–4455), anti-PMS2 (clone EPR 3947–Cellmarque, Ref. 760–453)—all ready to use.

Briefly, for PD-L1 staining paraffin sections were de-paraffinized in xylene and rehydrated through graded ethanol. After blocking peroxidase activity with hydrogen peroxide and antigen retrieval by heat induced using citrate buffer (pH 9.0), sections were incubated at 4°C with the primary rabbit monoclonal anti-PD-L1 antibody (1:50, clone 28–8, Abcam, Cambridge, MA). Avidin-biotin free short polymer-based peroxidase amplification system (Novolink, Novocastra, UK) and diaminobenzidine (DAB) (Sigma, D-5637, EUA) as chromogen were

used for development of reaction products. After the reactions, all sections were counterstained with hematoxylin.

2.4 | Immunohistochemical evaluation

IHC reactions for MMR were qualitatively interpreted as positive, negative, or inconclusive, according to the deposition of the chromogen product on the nuclei of the cancer cells. Tumors were considered negative for MLH1, MSH2, PMS2, or MSH6 expression only if there was a complete absence of nuclear staining in the TCs. GCs lacking MLH1, MSH2, PMS2, or MSH6 expression were considered microsatellite instability (MSI status) or MMR deficient, whereas GCs that maintained expression of all markers were considered as microsatellite stable (MSS status) or MMR proficient. Lymphocytes and normal epithelium served as positive internal controls.

For PD-L1 analysis, specimens were scored on the basis of the percentage of stained tumor cells (TCs) and tumor infiltrating immune cells (TIICs). PD-L1-positive cases were defined by the presence of at least 1% of TCs or TIICs with membrane staining, regardless of the intensity. The highest score was selected if two or three cores from the same case exhibited different PD-L1 expression scores. Melanoma metastasis samples previously recognized as positive were used as positive controls. Tris-buffered saline was used instead of primary antibody for negative controls.

IHC analysis was carried out by two pathologists (ESM and SFF) in a blinded manner. If there was difference between these two observers, these slides were reanalyzed by both investigators using a multiheaded microscope.

2.5 | EBV in situ hybridization

EBV status was determined by ISH using probes against Epstein-Barr encoded RNA 1 (EBER1) (Y5200, DAKO, Carpinteria, CA) by avidin-biotin peroxidase method. Known EBV-positive pharyngeal tumor specimens were used as positive controls, and slides treated without the probe were used as negative controls. Samples with dark-blue staining in tumor cell nuclei were considered positive.

2.6 | Statistical analysis

Descriptive statistics included frequencies with percent for nominal variables and mean with $\pm$ standard deviation (SD) or median $\pm$ interquartile range (IQR) for continuous variables. The Chi-square tests were used for categorical data and t-test for continuous data to evaluate the differences between the variables. Disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) were estimated using the Kaplan-Meier method, and differences in survival were examined using the Log Rank Test. To determine factors associated with DFS and OS, hazard ratios (HR) with 95% confidence intervals (95%CI) were calculated by univariate and multivariate Cox proportional hazard regression models. Variables that were significant on univariate analysis were included as co-variables a multivariate Cox regression to determine which variables independently affected prognosis.

DFS was calculated from the date of surgery to the date of relapse. OS was defined as the time between surgery and death of any cause or last follow-up. For the better comparative study of recurrence, postoperative mortality (defined as death within 30 days after surgery or until hospital discharge) was excluded from the DFS analysis. Statistical software package SPSS for Windows, version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for analyses. All CIs were stated at the 95% confidence level and all *P* values were two-sided. Statistical significance was defined as $P < 0.05$.

3 | RESULTS

3.1 | Patient characteristics

A total of 287 patients meet the inclusion criteria. Of these, 58.5% were male and mean age was 61.5 years-old (SD ± 12.1 , range 26-87). According to the American Society of Anesthesiologists (ASA) classification, 256 (82.9%) patients were ASA I/II and 31 (10.8%) ASA III/IV. Subtotal gastrectomy was performed in 60.6% of cases, and 55.7% of patients had poorly differentiated adenocarcinoma. The mean number of LNs retrieved was 41.8 (SD ± 17.7), and 56.4% of patients had LN metastasis. TNM stage was I/II in 158 cases (55.1%) and III/IV in 129 cases (44.9%). Neoadjuvant and adjuvant therapy were administered in 34 (11.8%) and 158 (55%) patients, respectively. Overall 30-day mortality was 4.2% (12 patients).

In situ hybridization or IHC analysis could not be performed for EBV, MSI, and PD-L1 in 1, 65, and 2 patients, respectively.

3.2 | Clinicopathologic characteristics of GC according to EBV status

Of 286 patients who were assessable by ISH, 30 (10.5%) patients had GC positive for EBV infection. All EBV-positive cases showed intense nuclear staining, with positivity observed in all tumor cells (Figure 1A). None of the cases were positive for the EBER/ISH reaction in the non-tumoral mucosa. Univariate analysis revealed that male gender ($P = 0.032$), proximal location ($P < 0.001$), total gastrectomy ($P < 0.001$), poorly differentiated histologic type ($P = 0.043$), undetermined type according to the Lauren classification ($P < 0.001$) and moderate/severe inflammatory infiltrate ($P < 0.001$) were associated with EBV-positive GC (Table 1).

3.3 | Clinicopathologic characteristics according to MMR deficiency

Among 222 studied GC, 60 (27%) had MSI. Isolated loss of MLH1, MSH2 and PMS2 expression occurred in 8, 1, and 13 cases, respectively (Figure 1B). One case showed simultaneous loss of expression of MSH2 and MSH6 and one of MLH1, MSH2, and PMS2. Most MSI cases had simultaneous loss of MLH1 and PMS2 (60%, 36 of 60 patients). The remaining 162 (73%) patients were classified as MMS, as they had normal expression of the four MMR proteins.

FIGURE 1 Representative images of in situ hybridization and immunohistochemical results. A, EBV-positive case by in situ hybridization; B, MSI gastric cancer, with loss of MLH-1 expression; and PD-L1-positive case, with (C) PD-L1 expression in tumor cells and (D) PD-L1 expression in tumor and immune cells of inflammatory infiltrate

The clinicopathologic characteristics according to MSI status are showed in Table 1. Older age ($P = 0.002$), subtotal resection ($P = 0.004$), absence of LN metastasis ($P = 0.016$), and lower TNM stage ($P = 0.018$) were related to MMR deficiency. Although the presence of moderate/severe inflammatory infiltrate was higher in MSI tumors than in MSS (40% vs 27.2%), this difference did not reach statistical significance ($P = 0.065$).

3.4 | Clinicopathologic characteristics according to PD-L1 expression

Among 285 cases, 25 cases (8.8%) were positive for PD-L1. PD-L1 expression was observed in tumor and/or immune cells, but not in non-neoplastic gastric epithelium (Figures 1C and 1D). According to the expression pattern, 18 of 25 cases (72%) showed a PD-L1 expression in TCs and 14 (56%) in TIICs. Simultaneous expression of PD-L1 (TCs and TIICs) was observed in seven cases. The percentage of stained TCs ranged from 1% to 80% (mean of 20.4%, $SD \pm 26.1$), while stained TIICs ranged from 1% to 30% (mean of 13.7%, $SD \pm 11.0$). Most of cases with PD-L1 positive expression showed a weak/moderate staining intensity. Only a few cases showed strong staining intensity in tumor/immune cells, in general these cases corresponded mainly to GC with solid-type histological features, than other histological subtypes.

PD-L1 expression was associated to macroscopic type I/II ($P = 0.002$) and undetermined Lauren classification ($P < 0.001$). No association was found between the PD-L1 immunoexpression and pN status ($P = 0.507$) or TNM stage ($P = 0.206$) (Table 2).

Considering the expression pattern of PD-L1 separately, PD-L1 TCs expression was more frequently observed in macroscopic type I/II ($P = 0.045$), undetermined Lauren classification ($P < 0.001$), poorly differentiated adenocarcinoma ($P = 0.015$), and moderate to severe lymphoid stroma ($P = 0.010$). Similar, PD-L1 expression in TIICs

correlated significantly with macroscopic type I/II ($P = 0.017$) and undetermined classification ($P = 0.002$). There were no significant differences between the others clinicopathological characteristics and PD-L1 expression in TC or TIIC.

Concerning IHC status, PD-L1 positivity was frequent in EBV-positive GC, presenting more intense and extensive immunostaining in these tumors. Among PD-L1-positive cases, 52% were EBV-positive, while in PD-L1 negative group only 6.5% had EBV-positivity ($P < 0.001$). A significantly higher incidence of EBV-positive cases were also observed when considering only PD-L1-positive TCs (66.7% vs 6.7%, $P < 0.001$) and PD-L1-positive TIICs (42.9% vs 8.9%, $P < 0.001$).

By contrast, the presence of MSI was similar between PD-L1-positive (26.1%) and PD-L1-negative (27.1%) GCs ($P = 0.915$). The same was observed regarding MSI-status when evaluated only TCs (31.2% for PD-L1-positive and 26.7% for PD-L1-negative, $P = 0.771$) and TIICs (21.4% for PD-L1-positive and 27.4% for PD-L1-negative, $P = 0.764$).

The MSI-status and EBV-positive GCs were mutually exclusive, except in two cases, which also showed positivity for PD-L1

3.5 | Prognosis and survival analysis

The median follow-up was 29 months (IQR 16–44 months). At the time of this study, 73 patients had disease recurrence (29 locoregional and 44 distant) and 84 patients died. The median follow-up was 36 months (mean of 38.3 months, $SD \pm 20.4$) for surviving patients. The 5-year DFS and 5-year OS rate for the entire cohort was 73.5% and 70.7%, respectively.

According to the IHC results, GCs were divided in three different groups. Among the 222 cases available for the two status (EBV and MSI), 19 cases (9%) were classified as EBV-positive group, 58 cases

TABLE 1 Clinicopathological characteristics of gastric cancer patients according to Epstein-Barr virus infection and microsatellite instability status

Variables	EBV infection		P	MMR expression		P
	EBV-negative n = 256 (%)	EBV-positive n = 30 (%)		MSS n = 162 (73%)	MSI n = 60 (27%)	
Age (years)			0.973			0.002
Mean ($\pm$ SD)	61.5 ($\pm$ 12.2)	61.4 ($\pm$ 11.2)		60.1 ($\pm$ 11.5)	65.8 ($\pm$ 12.5)	
Sex			0.032			0.236
Male	144 (56.2)	23 (76.7)		98 (60.5)	31 (51.7)	
Female	112 (43.8)	7 (23.3)		64 (39.5)	29 (48.3)	
Tumor site			<0.001			0.217
Upper	26 (10.2)	8 (26.7)		18 (11.1)	6 (10)	
Middle	45 (17.6)	7 (23.3)		33 (20.4)	9 (15)	
Lower	179 (69.9)	11 (36.7)		103 (63.6)	45 (75)	
Others	6 (2.3)	4 (13.3)		8 (4.9)	0 (0)	
Type of resection			<0.001			0.004
Subtotal	165 (65.5)	8 (26.7)		90 (55.6)	46 (76.7)	
Total	91 (35.5)	22 (73.3)		72 (44.4)	14 (23.3)	
Tumor size			0.075			0.118
Mean ($\pm$ SD)	4.8 (3.0)	6.4 ($\pm$ 4.4)		4.8 ($\pm$ 3.3)	5.5 ($\pm$ 3.2)	
Grade of histological differentiation			0.043			0.531
Well/moderately	118 (46.1)	8 (26.7)		68 (42)	28 (46.7)	
Poorly	138 (53.9)	22 (73.3)		94 (58)	32 (53.3)	
Lauren type			<0.001			0.087
Intestinal	125 (48.8)	11 (36.7)		72 (44.4)	34 (56.7)	
Diffuse	101 (39.5)	8 (26.7)		68 (42)	15 (25)	
Mixed	24 (9.4)	4 (13.3)		12 (7.4)	8 (13.3)	
Undetermined	6 (2.3)	7 (23.3)		10 (6.2)	3 (5)	
Tumor invasion			0.440			0.127
pT1/pT2	104 (40.6)	10 (33.3)		60 (37)	29 (48.3)	
pT3/pT4	152 (59.4)	20 (66.7)		102 (63)	31 (51.7)	
pN status			0.699			0.016
pN negative	110 (43)	14 (46.7)		60 (37)	33 (55)	
pN positive	146 (57)	16 (53.3)		102 (63)	27 (45)	
Lymphatic invasion			0.783			0.104
Absent	125 (49)	15 (51.7)		81 (50.6)	23 (38.3)	
Present	130 (51)	14 (48.3)		79 (49.4)	37 (61.7)	
Venous invasion ^a			0.506			0.439
Absent	169 (66.3)	21 (72.4)		105 (65.6)	36 (60)	
Present	86 (33.7)	8 (27.6)		55 (34.4)	24 (40)	
Perineural invasion ^a			0.453			0.216
Absent	132 (52.2)	13 (44.8)		80 (50.6)	36 (60)	
Present	121 (47.8)	16 (55.2)		78 (49.4)	24 (40)	
Peritumoral inflammatory infiltrate			<0.001			0.065
Absent/weak	182 (71.1)	8 (26.7)		118 (72.8)	36 (60)	
Moderate/severe	74 (28.9)	22 (73.3)		44 (27.2)	24 (40)	
pTNM stage			0.553			0.018

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Variables	EBV infection		<i>P</i>	MMR expression		<i>P</i>
	EBV-negative <i>n</i> = 256 (%)	EBV-positive <i>n</i> = 30 (%)		MSS <i>n</i> = 162 (73%)	MSI <i>n</i> = 60 (27%)	
I/II	139 (54.3)	18 (60)		82 (50.6)	41 (68.3)	
III/IV	117 (45.7)	12 (40)		80 (49.4)	19 (31.7)	

EBV, Epstein-Barr virus; MMR, mismatch repair; MSS, microsatellite stable; MSI, microsatellite instability; SD, standard deviation.

The *P* values in bold are statistically significant.

^aSome cases were not assessed for this status due to absence of the respective information in the original histopathological report.

MSI group (27%) and 143 cases (64%) EBV-negative/MSS group. Two of the patients presenting MSI and positivity for EBV infection were not classified in any of the groups.

Using EBV-negative/MSS group as reference, MSI GCs patients showed significant better survival, with 3-year DFS rate of 86.2% ($P = 0.006$) and 5-year OS of 77.6% ($P = 0.049$). Three-year DFS and 5-year OS rates were similar between EBV-positive GC and reference group ($P = 0.598$ and $P = 0.118$, respectively) (Figure 2).

Also, when evaluating survival considering only EBV status, there was no significant difference in 3-year DFS rate between EBV-positive and EBV-negative patients (70% vs 73.8%, respectively, $P = 0.610$) and in 5-year OS rate (76.7% vs 69.9%, respectively, $P = 0.432$). Likewise, considering only the instability profile, MSI patients had longer 3-year DFS rate compared to MSS patients (85% vs 68.8%, $P = 0.011$) and 5-year OS was superior in the MSI group but this did not achieve statistical significance (76.7% vs 69.1%, $P = 0.116$).

Regarding PD-L1 expression, survival rates were similar for PD-L1-positive and PD-L1-negative patients: 3-year DFS of 73.9% and 73.2% ($P = 0.974$), respectively; and 5-year OS of 72% and 70.4% ($P = 0.908$), respectively.

Considering the different expression patterns, no difference in 5-year OS was observed regarding PD-L1 expression in TCs (63.6%, $P = 0.717$), TIICs (57.1%, $P = 0.182$), or both (100%, $P = 0.164$) when compared to the PD-L1-negative (70.5%) (determined as reference group). Similarly, no differences were observed in 3-year DFS with respect to PD-L1 expression in TCs (63.6%, $P = 0.364$), TIICs (80%, $P = 0.722$) or both (85.7%, $P = 0.500$) when compared to the PD-L1-negative (73.3%) (reference group). When adjusted for the presence of LN metastasis, 3-year DFS was significantly worse for PDL1-positive TCs pN+ group compared to the reference group (PDL1-negative TCs with pN+) (20% vs 60.8%, $P = 0.001$).

3.6 | Analysis of prognostic factors

Univariate and multivariate analysis were performed to evaluate the prognostic factors affecting 3-year DFS and 5-year OS (Table 3).

Multivariate analysis identified pT3/pT4 and LNM as independent factors associated with significantly lower 3-year DFS. Furthermore, in the cox regression multivariate analysis the presence of MSI was significantly associated with longer 3-year DFS in GC patients, while EBV and PD-L1 expression were not significant prognostic factors for recurrence.

Regarding OS, multivariate analysis revealed that total gastrectomy and pT3/pT4 status were associated to worse 5-year OS. There was no significant association between EBV, MSI, and PD-L1 expression and patient survival.

4 | DISCUSSION

In this study we investigated the GC subtypes EBV-positive and MSI, as well as the PD-L1 immunoexpression in surgically resected specimens of GC using techniques available in the routine histological diagnosis. The results demonstrated that IHC and ISH methodologies can identify GC subtypes comparable to the molecular classification.⁴ PD-L1 expression was significantly associated to EBV-positive GC, but not with MSI GCs. Furthermore, MSI status was found to be an independent factor associated to improved prognosis and survival.

Recent data suggests that GC is a complex disease comprised of four main molecular subtypes. The addition of molecular classification is a promising strategy in the clinical management of patients with GC, allowing not only better understanding of the disease and more precise prognosis, but also opening the possibility to develop and perform genome-guided personalized therapy, especially with regard to EBV and MSI status.¹⁵

In this research, 10.5% of patients were EBV-positive and 27% had MSI, which is comparable to the rates seen in TCGA, (9% and 22% of GCs, respectively).⁴ The simultaneous loss of MLH1 and PMS2 expression was the most common type of instability (60% in our study), as also described by Kim et al¹⁶ in 71.4% of their MSI GC cases.

In particular, EBV-positive and MSI tumors have been reported as distinct clinicopathological entities. Similar to literature data, EBV-positive GC was predominant in male patients, in lesions of the proximal stomach, and poorly differentiated histologic type with prominent inflammatory infiltrate.^{17,18} Although some authors reported that both EBV and MSI GC usually are less aggressive, with lower depth of invasion in the gastric wall and infrequent LN metastasis,^{19–22} only MSI CG was associated with pN0 status and lower TNM stage. Additionally, as expected MSI GC occurred more frequently in older patients than MSS GC, since epigenetic changes including methylation intensifies as age increases.²³

Recent studies have suggested that EBV-positive and MSI GC may be prime candidates for immunotherapeutic agents targeting T-cell immune checkpoints, particularly PD-1/PD-L1 directed therapy.^{4,7,24}

TABLE 2 Clinicopathological characteristics of gastric cancer patients according to programmed death ligand 1 (PD-L1) expression

Variables	PD-L1-negative n = 260 (%)	PD-L1-positive n = 25 (%)	P
Age (years)			0.502
Mean ($\pm$ SD)	61.4 ($\pm$ 12.0)	63.1 ($\pm$ 12.6)	
Sex			0.318
Male	150 (57.7)	17 (68)	
Female	110 (42.3)	8 (32)	
Tumor site			0.981
Upper	31 (11.9)	3 (12)	
Middle	48 (18.5)	4 (16)	
Lower	172 (66.2)	17 (68)	
Others	9 (3.5)	1 (4)	
Type of resection			0.641
Subtotal	158 (60.8)	14 (56)	
Total	102 (39.2)	11 (44)	
Macroscopic type ^a			0.002
I/II	57 (23.8)	12 (54.5)	
III/IV	183 (76.2)	10 (45.5)	
Tumor size			0.056
Mean ($\pm$ SD)	4.8 ($\pm$ 3.1)	6.4 ($\pm$ 4.0)	
Grade of histological differentiation			0.880
Well/moderately	119 (45.8)	7 (28)	
Poorly	141 (54.2)	18 (72)	
Lauren type			<0.001
Intestinal	128 (49.2)	8 (32)	
Diffuse	103 (39.6)	5 (20)	
Mixed	24 (9.2)	4 (16)	
Undetermined	5 (1.9)	8 (32)	
Tumor invasion			0.696
pT1/2	104 (40)	9 (36)	
pT3/4	156 (60)	16 (64)	
pN status			0.175
pN negative	109 (41.9)	14 (56)	
pN positive	151 (58.1)	11 (44)	
Lymphatic invasion ^a			0.928
Absent	127 (49)	12 (50)	
Present	132 (51)	12 (50)	
Venous invasion ^a			0.170
Absent	176 (68)	13 (54.2)	
Present	83 (32)	11 (45.8)	
Perineural invasion ^a			0.249
Absent	129 (50.2)	15 (62.5)	
Present	128 (49.8)	9 (37.5)	
Peritumoral inflammatory infiltrate			0.103
Absent/weak	177 (68.1)	13 (52)	

(Continues)

TABLE 2 (Continued)

Variables	PD-L1-negative n = 260 (%)	PD-L1-positive n = 25 (%)	P
Mod/severe	83 (31.9)	12 (48)	
pTNM stage			0.163
I/II	139 (53.5)	17 (68)	
III/IV	121 (46.5)	8 (32)	

SD, standard deviation.

The P values in bold are statistically significant.

^aSome cases were not assessed for this status due to absence of the respective information in the original histopathological report.

PD-L1 is a transmembrane surface glycoprotein encoded by the CD274 gene expressed by several cell types of the immune system (as lymphocytes and dendritic cells), but can also be expressed in tumor cells. Although PD-L1 has been reported in several solid tumors, only few studies investigated its expression in GC.²⁵ A meta-analysis showed that PD-L1 positivity in GC ranges from 14.3–69.4%.²⁶ In this patient cohort only 8.8% of patients had PD-L1 expression on either TCs or TIICs, this is much lower than the 40% rate of PD-L1 overexpression seen in the phase I trial of pembrolizumab for advanced GC.⁷

The binding of PD-L1 to its receptor PD-1 (expressed on activated T cells) can induce the suppression of T-cell receptor signaling resulting in down regulation of the immune response, which enables tumor cells to escape immune destruction. Accordingly, therapy with anti-PD-L1/PD-1 may prevent this interaction, restoring cancer cell-directed immune response.²⁷

In general, PD-L1 is expressed on TCs by innate immune resistance and adaptive immune resistance. In the innate immune resistance, constitutive oncogenic signaling induces PD-L1 expression, whereas in cases of adaptive immune resistance, the PD-L1 upregulation is induced by tumor infiltrating T-cells.²⁷ Our study demonstrated that GC with PD-L1-positive TCs were associated with an intense inflammatory infiltrate (61.1% of cases), which may suggest that the adaptive immune resistance contributes more to PD-L1 expression in GC than innate immune resistance.

Several researchers have demonstrated that PD-L1 expression in GC was significantly higher in EBV and MMR-deficient tumors.^{4,5,28} A recent study showed that PD-L1 positivity was more frequent in MSI than MSS GCs on both TCs (72.0% vs 20.1%, $P < 0.001$) and TIICs (96.0% vs 59.5%, $P < 0.001$). Similarly, PD-L1 positivity on TCs and TIICs was more frequent in EBV-positive than in EBV-negative GC (52.0% vs 21.2%, $P = 0.001$; and 80.0% vs 60.4%, $P < 0.001$; respectively).⁵

This study also observed that PD-L1 expression was enriched in EBV-positive GC (52% of PD-L1-positive cases had EBV infection, while only 6.5% in PD-L1-negative group had EBV-positive). However, no differences were observed in PD-L1 expression between MSI and MSS GCs. Thus, our findings suggest that anti-PD-1/PD-L1 antibodies may have more therapeutic efficacy in EBV-positive GC. It is worth mentioning that EBV status was not collected in phase 1b

FIGURE 2 Kaplan-Meier survival curve analysis. A, Overall survival and (B) disease-free survival of GC patients according to the IHC profile. *EBV-negative and microsatellite stable (MSS) cases were considered as reference group

KEYNOTE-012 study, so we have no evidence if there is an association between EBV-positivity and outcome in the context of pembrolizumab therapy.⁷ In contrast, pembrolizumab has shown promising efficacy in for patients with MSI.²⁴

Some characteristics have been described to support the conjecture that EBV and MSI tumors are subtypes that would potentially benefit from anti-PD-1/PD-L1 therapy. TCGA study demonstrated that the interferon (IFN)- γ gene, an additional marker of sensitivity to PD-1 therapy, was enriched in EBV-positive and MSI GCs.⁴ IFN- γ plays an important role in the adaptive immune response against EBV infection and MSI immunogenic peptides, and its release by T-cells can directly induce PD-L1 expression.²⁹ Furthermore, PD-1/PD-L1 inhibition appears to be more effective in tumors with preexisting antitumor response—especially CD8 T-cells. As widely known, EBV and MSI GC are often associated with a rich lymphocytic infiltration in tumor stroma, which has a high number of CD8 T cells able to produce a marked antitumor inflammatory response.^{30–32}

One of the main highlights of molecular classification refers to the best prognostic definition based on the division of subgroups. Both EBV and MSI tumors have been related to better survival.^{4,22,33} Host immune response to EBV infection and against immunogenic antigens due to mismatch-repair defects appear to influence the prognosis and can be an explanation for the distinct survival pattern in these subtypes.^{17,30} However, in the present study only MSI showed better survival rates and was an independent prognostic factor for DFS in GC patients. Perhaps other factors related to EBV infection, including the proportion of tumor-infiltrating lymphocytes, also play a role in determining the prognosis rather than EBV infection alone. Since the best prognosis is associated mainly when CD3+ and CD8+ T-lymphocytes are predominant in the inflammatory infiltrate, which had antitumor activity.^{5,30,34}

Regarding PD-L1, the prognostic impact of its expression in patients with GC remains controversial to date. In general, studies have small populations and few meta-analyses have shown a correlation between PD-L1 and prognosis.^{25,26,35,36} Some authors showed that PD-L1-positive expression was associated to poor prognosis in advanced GC,^{37,38} whereas other studies proposed that increased PD-L1 expression are related to a better prognosis.^{34,39} Still, some

authors have shown no impact on survival.⁵ In this investigation, no association between PD-L1 expression and the prognosis was observed. Also, we found that PD-L1 protein expression was more frequently in TCs than TIICs, different from previous studies.^{5,39} Our results showed that only PD-L1 expression in tumor cell of pN+ GC patients was associated to poor prognosis, which requires a careful interpretation and further exploration in a large population. As only 25 patients were PD-L1-positive, these may have limited the survival analysis. Furthermore, this variability in reported outcomes might be influenced in part by the patient cohort, since we had 55.1% of GCs staged as I/II and high PD-L1 levels seems to be related to more advanced stages.^{26,37,39}

Recently, with the approval of PD-1 monoclonal antibody pembrolizumab and nivolumab by US Food and Drug Administration (FDA) and the currently undergoing trials of anti-PD-1/PD-L1 antibodies for the treatment of advanced GC, that have shown promising clinical efficacies for molecular subgroups,^{7,24,40} the evaluation of predictive biomarkers that can serve as therapeutic indication to more specific treatments becomes increasingly important in the diagnostic routine.

We categorized EBV-positive GC and MSI GC in two distinct histologic subsets using well-defined and easily reproducible methodologies to assess whether such a histologic sub-classification may be helpful in predicting prognosis. In this sense, we managed to overcome two major obstacles of addressing molecular signatures in practice: the cost effectiveness and technical complexity. Our IHC/ISH results were consistent with previous comprehensive molecular studies, and the methods are simple and cost-effective manner with practical application on a day-to-day basis.

Nonetheless, an accurate interpretation of IHC stains is still crucial for the establishment of a valid predictive biomarker based on histology, particularly with regard to PD-L1. The discrepancies in result may be explained, in part, by absence of a well-established evaluation criterion for PD-L1 expression and the lack of homogeneity among the studies. The cutoff values for positivity varied (ranges from >1% to 50%, we used $\geq 2\%$) and there is no definition of which pattern of expression should be evaluated (tumor cells/inflammatory infiltrate cells) or the antibody clones used. Moreover, in the preoperative

TABLE 3 Univariate and multivariate analyses of risk factors affecting survival in patients with gastric cancer

Variables	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
Disease-free survival						
Male (vs female)	1.12	0.70-1.80	0.636	-	-	-
Age >65 (vs <65 years)	0.64	0.39-1.05	0.078	-	-	-
Diffuse/mixed Lauren type (vs. intestinal/indeterminate)	1.64	1.03-2.62	0.038	0.84	0.41-1.77	0.651
Poorly differentiated (vs well/moderately)	2.25	1.34-3.75	0.002	1.97	0.89-4.37	0.097
pT3/pT4 status (vs pT1/pT2)	11.82	4.76-29.33	<0.001	6.32	2.08-19.18	0.001
Presence of LNM (vs absence)	6.70	3.33-13.48	<0.001	2.48	1.02-6.07	0.046
Presence of lymphatic invasion (vs absence)	2.98	1.78-4.98	<0.001	1.32	0.71-2.45	0.369
EBV-positive (vs EBV-negative)	1.20	0.60-2.41	0.613	-	-	-
MSI (vs MSS)	0.41	0.20-0.84	0.015	0.48	0.23-0.99	0.049
PD-L1 positive (vs PD-L1 negative)	1.01	0.44-2.34	0.975	-	-	-
Neoadjuvant therapy (vs absence)	1.39	0.73-2.64	0.313	-	-	-
Adjuvant therapy (vs absence)	0.21	0.11-0.40	<0.001	1.01	0.45-2.27	0.976
Overall survival						
Male (vs female)	1.05	0.68-1.63	0.817	-	-	-
Age>65 (vs <65 years)	1.22	0.80-1.88	0.357	-	-	-
Total gastrectomy (vs subtotal)	2.22	1.44-3.41	<0.001	1.85	1.20-2.85	0.006
Diffuse/mixed Lauren type (vs intestinal/indeterminate)	1.58	1.02-2.44	0.039	0.95	0.53-1.72	0.873
Poorly differentiated (vs well/moderately)	2.03	1.27-3.26	0.003	1.58	0.83-2.99	0.164
pT3/pT4 status (vs pT1/pT2)	4.46	2.46-8.05	<0.001	3.09	1.60-5.96	0.001
Presence of LNM (vs absence)	2.90	1.75-4.80	<0.001	1.52	0.86-2.68	0.147
EBV-positive (vs EBV-negative)	0.73	0.34-1.59	0.436	-	-	-
MSI (vs MSS)	0.63	0.35-1.32	0.121	-	-	-
PD-L1 positive (vs PD-L1 negative)	1.05	0.48-2.27	0.909	-	-	-
Neoadjuvant therapy (vs absence)	1.02	0.53-1.98	0.947	-	-	-
Adjuvant therapy (vs absence)	0.71	0.45-1.11	0.136	-	-	-

HR, hazard ratio; 95CI, 95% confidence interval; LNM, lymph node metastasis; EBV, Epstein-Barr virus; MSS, microsatellite stable; MSI, microsatellite instability.

The *P* values in bold are statistically significant.

context, the diagnosis of PD-L1 expression by biopsy must be reliable. Remarkable, we observed that PD-L1-positive tumor cells were relatively lower and assessment of different percentages of three different staining intensities was indiscernible and not feasible in practice. Thus, it is advisable that IHC analysis to be performed on multiple biopsy specimens to avoid underestimation of PD-L1-positive GCs. Besides PD-L1, EBV and MSI status, it can be important to determine which others clinicopathological characteristics may have important clinical implications and may serve as a surrogate marker for PD-L1/PD-1-expression, in order to optimize the therapeutic indication.

Some limitations in the present study should be considered. This was a single-center study, some of the groups had a small number of cases (particularly the PD-L1-positive) and some patients have a relatively short follow-up. Regarding the technical limitations, we cannot exclude the risk of false-negative results for PD-L1 (due to its

heterogeneous expression and the fact that TMA technique only evaluates small samples of the tumor).⁴¹ In addition, as few GCs had PD-L1 expression, we dichotomized our results into negative and positive staining for PD-L1. Thus, we were not able to measure if differences in percentage of stained cells may have different impact on tumor biology and can be associated to patient survival.

Among the strengths, the study was conducted in a public high-volume center, reference in cancer treatment. The cohort represents western patients treated with potentially curative intent by high volume surgeons. To ensure a reliable assessment of prognosis and other surgically related variables, only standard D2-gastrectomy was considered. The mean number of LNs retrieved was high, attesting the high quality surgery and pathology, and the low risk of understaging. This risk was even reduced, since IHC for cytokeratin was performed for the detection of occult tumor cells in selected cases.¹⁴ To avoid loss and provide a representation of different tumor areas, we used a large

number of cores per case. A standardized definition of IHC/ISH analysis was used and the final results were presented categorically, without disagreement between the cores of tissue. Moreover, previously incompletely addressed by other investigators, we explored PD-L1 expression in tumor and immune cells, which may be clinically relevant in the context of response to therapy in the future.

Therefore, the current investigation may have relevant clinical implications for GC. In addition to confirming MSI status as a predictive factor for better prognostic and showing that the association of PD-L1 expression with EBV may guide the use of immunotherapy for these patients, our data provide evidence that the definition of these categories is a strategy of easy implementation in the routine pathological examination.

5 | CONCLUSION

EBV-positive GC associates to increased PD-L1 expression and shows to be a potential target for specific antibody therapies. MSI GC have better survival outcome. Recognition of these subgroups by routine diagnostic techniques is feasible, allows for more meticulous staging and may guide neo/adjuvant treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their gratitude to Evelise Pelegrinelli Zaidan (Department of Gastroenterology, ICESP-HC, FMUSP), Alda Wakamatsu and Aline K. Assato (Department of Pathology—LIM14, FMUSP) for their technical assistance in this study.

CONFLICTS OF INTEREST

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. The authors declare that they have no conflict of interest.

ORCID

Marcus F.K.P. Ramos <http://orcid.org/0000-0003-0200-7858>

REFERENCES

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136:E359–E386.
2. Washington K. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:3077–3079.
3. Zhang W. TCGA divides gastric cancer into four molecular subtypes: implications for individualized therapeutics. *Chin J Cancer*. 2014;33:469–470.
4. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513:202–209.
5. Kawazoe A, Kuwata T, Kuboki Y, et al. Clinicopathological features of programmed death ligand 1 expression with tumor-infiltrating lymphocyte, mismatch repair, and Epstein-Barr virus status in a large cohort of gastric cancer patients. *Gastric Cancer*. 2017;20:407–415.
6. Garattini SK, Basile D, Cattaneo M, et al. Molecular classifications of gastric cancers: novel insights and possible future applications. *World J Gastrointest Oncol*. 2017;9:194–208.
7. Muro K, Chung HC, Shankaran V, et al. Pembrolizumab for patients with PD-L1-positive advanced gastric cancer (KEYNOTE-012): a multicentre, open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol*. 2016;17:717–726.
8. Raufi AG, Klempner SJ. Immunotherapy for advanced gastric and esophageal cancer: preclinical rationale and ongoing clinical investigations. *J Gastrointest Oncol*. 2015;6:561–569.
9. Shah MA, Khanin R, Tang L, et al. Molecular classification of gastric cancer: a new paradigm. *Clin Cancer Res*. 2011;17:2693–2701.
10. Japanese Gastric Cancer A. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2014 (ver. 4). *Gastric Cancer*. 2017;20:1–19.
11. Dias AR, Pereira MA, Mello ES, et al. Carnoy's solution increases the number of examined lymph nodes following gastrectomy for adenocarcinoma: a randomized trial. *Gastric Cancer*. 2016;19:136–142.
12. Pereira MA, Dias AR, Faraj SF, et al. Carnoy's solution is an adequate tissue fixative for routine surgical pathology, preserving cell morphology and molecular integrity. *Histopathology*. 2015;66:388–397.
13. Tang L, Berlin J, Burgart L, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with carcinoma of the stomach. *College of American Pathologists (CAP)*. 2014;3:1–19.
14. Pereira MA, Ramos MFKP, Dias AR, et al. Detection of occult lymph node tumor cells in node-negative gastric cancer patients. *Arq Bras Cir Dig*. 2017;30:30–34.
15. Sunakawa Y, Lenz HJ. Molecular classification of gastric adenocarcinoma: translating new insights from the cancer genome atlas research network. *Curr Treat Options Oncol*. 2015;16:17.
16. Kim HS, Shin SJ, Beom SH, et al. Comprehensive expression profiles of gastric cancer molecular subtypes by immunohistochemistry: implications for individualized therapy. *Oncotarget*. 2016;7:44608–44620.
17. Ramos MFKP, Pereira MA, Dias AR, et al. Lymphoepithelioma-like gastric carcinoma: clinicopathological characteristics and infection status. *J Surg Res*. 2017;210:159–168.
18. Fukayama M. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Pathol Int*. 2010;60:337–350.
19. Shokal U, Sharma PC. Implication of microsatellite instability in human gastric cancers. *Indian J Med Res*. 2012;135:599–613.
20. Song HJ, Kim KM. Pathology of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and its relationship to prognosis. *Gut Liver*. 2011;5:143–148.
21. Setia N, Agoston AT, Han HS, et al. A protein and mRNA expression-based classification of gastric cancer. *Mod Pathol*. 2016;29:772–784.
22. Ahn S, Lee SJ, Kim Y, et al. High-throughput protein and mRNA expression-based classification of gastric cancers can identify clinically distinct subtypes, concordant with recent molecular classifications. *Am J Surg Pathol*. 2017;41:106–115.
23. Nakajima T, Akiyama Y, Shiraishi J, et al. Age-related hypermethylation of the hMLH1 promoter in gastric cancers. *Int J Cancer*. 2001;94:208–211.
24. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372:2509–2520.
25. Wu P, Wu D, Li L, et al. PD-L1 and survival in solid tumors: a meta-analysis. *PLoS ONE*. 2015;10:e0131403.
26. Gu L, Chen M, Guo D, et al. PD-L1 and gastric cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 2017;12:e0182692.
27. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:252–264.

28. Derks S, Liao X, Chiaravalli AM, et al. Abundant PD-L1 expression in Epstein-Barr virus-infected gastric cancers. *Oncotarget*. 2016;7:32925–32932.
29. Ritprajak P, Azuma M. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2015;51:221–228.
30. Grogg KL, Lohse CM, Pankratz VS, et al. Lymphocyte-rich gastric cancer: associations with Epstein-Barr virus, microsatellite instability, histology, and survival. *Mod Pathol*. 2003;16:641–651.
31. Teng MW, Ngiew SF, Ribas A, et al. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. *Cancer Res*. 2015;75:2139–2145.
32. Kim KJ, Lee KS, Cho HJ, et al. Prognostic implications of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells and CD8+ cytotoxic T cells in microsatellite-unstable gastric cancers. *Hum Pathol*. 2014;45:285–293.
33. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med*. 2015;21:449–456.
34. Kim JW, Nam KH, Ahn SH, et al. Prognostic implications of immunosuppressive protein expression in tumors as well as immune cell infiltration within the tumor microenvironment in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2016;19:42–52.
35. Liu YX, Wang XS, Wang YF, et al. Prognostic significance of PD-L1 expression in patients with gastric cancer in East Asia: a meta-analysis. *Onco Targets Ther*. 2016;9:2649–2654.
36. Xu F, Feng G, Zhao H, et al. Clinicopathologic significance and prognostic value of B7 homolog 1 in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94:e1911.
37. Fang W, Chen Y, Sheng J, et al. Association between PD-L1 Expression on tumour-infiltrating lymphocytes and overall survival in patients with gastric cancer. *J Cancer*. 2017;8:1579–1585.
38. Gao Y, Li S, Xu D, et al. Prognostic value of programmed death-1, programmed death-ligand 1, programmed death-ligand 2 expression, and CD8(+) T cell density in primary tumors and metastatic lymph nodes from patients with stage T1-4N + M0 gastric adenocarcinoma. *Chin J Cancer*. 2017;36:61.
39. Böger C, Behrens HM, Mathiak M, et al. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. *Oncotarget*. 2016;7:24269–24283.
40. Bilgin B, Sendur MA, Bulent AM, et al. Targeting the PD-1 pathway: a new hope for gastrointestinal cancers. *Curr Med Res Opin*. 2017;33:749–759.
41. Ilyas M, Grabsch H, Ellis IO, et al. Guidelines and considerations for conducting experiments using tissue microarrays. *Histopathology*. 2013;62:827–839.

How to cite this article: Pereira MA, Ramos MF, Faraj SF, et al. Clinicopathological and prognostic features of Epstein-Barr virus infection, microsatellite instability, and PD-L1 expression in gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2018;1–11. <https://doi.org/10.1002/jso.25022>

SYNOPSIS

This study investigates the *Epstein-Barr* virus (EBV), microsatellite instability (MSI) and PD-L1 immunoexpression in a large western cohort of gastric cancer (GC) patients who underwent surgical resection with potentially curative intent. This is a topic of great interest since molecular classification of GC may serve as a prognostic stratification and assist in the development of genome-guided personalized therapy, especially with regard to EBV and MSI status. This manuscript presents GC profiles in a western population using feasible methodological strategies to define EBV and MSI categories.