



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

**EXPRESSÃO IMUNOFENOTÍPICA DA PD-1 E PD-L1 EM
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO DE PACIENTES
ATENDIDOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE
BARROS BARRETO**

Érika Thaianne Couto Canelas

BELÉM - PA

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

**EXPRESSÃO IMUNOFENOTÍPICA DA PD-1 E PD-L1 EM
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO DE PACIENTES
ATENDIDOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE
BARROS BARRETO**

Autora: Érika Thaianne Couto Canelas

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Samia Demachki

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Patologia, Clínica e Terapia Oncológica, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

BELÉM - PA

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB/UFPA)

Canelas, Érika Thaianie Couto, 1993-

Expressão imunofenotípica da PD-1 e PD-L1 em adenocarcinoma gástrico de pacientes atendidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto. / Érika Thaianie Couto Canelas; Orientadora, Prof.^a Dr.^a Samia Demachki. — 2017.

103 f. : il. ; color. : 30 cm.

Inclui bibliografias.

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Pará, Núcleo de Pesquisa em Oncologia, Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, Belém, 2017.

1. Neoplasias gástricas Tipo 1. 2. Adenocarcinoma. 3. Imunoterapia. I. Demachki, Samia, *orient.* II. Título.

CDD - 23. ed. 616.99433098115

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FONTES FINANCIADORAS

Instituições Participantes:

a) Universidade Federal do Pará (UFPA):

- Laboratório de Imunoistoquímica e Patologia Molecular da Anatomia Patológica do Núcleo de Pesquisas em Oncologia (NPO) da Universidade Federal do Pará
- Serviços de Cirurgia e Anatomia Patológica do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUIBB-UFPA);

b) Fontes Financiadoras:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Érika Thaianne Couto Canelas

EXPRESSÃO IMUNOFENOTÍPICA DO PD-1/PD-L1 EM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO DE PACIENTES ATENDIDOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Patologia, Clínica e Terapia Oncológica, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Aprovado em: 31/08/2017

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a. Dr.^a. Samia Demachki – Universidade Federal do Pará
Orientadora

Prof. Dr. André Salim Khayat – Universidade Federal do Pará
Membro da Banca

Prof. Dr. Leônidas Braga Dias Junior – Universidade do Estado do Pará
Membro da Banca

Prof. Dr. Paulo Pimentel Assumpção – Universidade Federal do Pará
Membro da Banca

Belém-PA

2017

DEDICATÓRIA

*Deus por seu apoio incondicional, que tanto contribuiu para
superação das dificuldades encontradas nessa jornada.*

A minha família e amigos por todo amor, apoio e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, ao mestre amigo Jesus e a toda equipe espiritual que certamente esteve ao meu lado, mentalizando energias benfazejas que foram essenciais para acalmar meu coração em todos os momentos de dificuldade e deram aporte para que eu seguisse avante.

A minha família por todo carinho, amor, inventivo, paciência e compreensão, especialmente à minha mãe Iracélia Couto, minha irmã Ellen Canelas, Minha tia Nilce Couto e a minha prima Júlia Lima.

Aos meus amigos da Associação Espírita Boa Vontade e do Centro Espírita Caminhando com Jesus, principalmente à Ronilda Ribeiro, Jaime Pimentel, Elen Flávia, Francisco, Rosinha, Ricardo, Rosilene, João Souza, Marta Barbosa, Carlos Freire, Lilian Fialho, Tânia Goes e Nicolau.

Aos amigos do serviço de anatomia patológica que desde sempre me acolheram e foram grandes mestres, proporcionando momentos ricos em alegria e aprendizados que certamente carregarei para a vida toda, especialmente a Dra Marialva, Dra. Elcy Mika, Leonardo Kepler, Ana Karyssa, Floriano, Ila, Sabrina, Heloisa, Hildecleia, Cristiane, Osmarino, Georgetown, Irenilce e Elisângela.

Aos amigos e crianças que fazem parte do Movimento Bandeirante no Pará, principalmente à Jaira Ataíde, Jaira Brito, Jair Tavares, Raimundo Silva, Ramon Brito, Jamilly Brito, Andreza Raiol, Bia Farias, Claudia, Dona Creuza, Renata Maués, Regiane Medeiros, Renan Souza, Dona Messias, Sandra, Jardel, Tayuans Albuquerque, Hamilton Freitas, Nazareno, Caroline Rosário, Cristiane, Malena, Ramon Santos.

Aos amigos de mestrado, Jaqueline Rodrigues e Jânio de Jesus, por todo companheirismo e carinho.

A todos os amigos que deram força, carinho e vibrações positivas para que eu realizasse esse sonho, em especial à Anaelle Souza, Géssica Capela, Marcelli Oliveira, Ludmilla Dantas, Hilda, Michel, Marjorie, Breno (*In memoriam*), Gabrielle Rocha, Jonathan Silva, Magna, Lucas Garcia, Durval Lopes.

A todos os Professores do curso de pós-graduação em oncologia e ciências médicas, pela dedicação, competência e carinho ao repassar todos os valiosos ensinamentos durante a minha jornada no mestrado.

A minha orientadora, a Prof^a. Dr^a Samia Demachki, por todo o auxílio, dedicação, competência, paciência e incentivo no decorrer da elaboração deste trabalho de dissertação.

EPÍGRAFE

“O segredo da criatividade está em dormir bem e abrir a mente para as possibilidades infinitas.

O que é um homem sem sonhos?”

- Albert Einstein

“Construímos muros demais e pontes de menos.”

- Isaac Newton

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças”

- Charles Darwin

RESUMO

EXPRESSÃO IMUNOFENOTÍPICA DO PD-1/PD-L1 EM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO DE PACIENTES ATENDIDOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO

O câncer gástrico é a terceira causa de morte relacionada ao câncer em ambos os gêneros, e em estágio avançado o prognóstico tem sido pouco favorável. Os tumores humanos tem propensão a escapar da imunovigilância, e um dos eixos envolvidos nesse cenário é o PD-1, um receptor expresso na superfície de células, e o seu ligante PD-L1, aos quais já foram detectados em amostras de adenocarcinoma gástrico. Este estudo realizou a caracterização da expressão imunofenotípica das proteínas PD-1 e PD-L1 em tecido adjacente ao tumor, tecido de Adenocarcinoma Gástrico primário, associado a achados clinico-demográficos e patológicos dos pacientes atendidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto, entre 2008 a 2016. Foram selecionadas 92 amostras de pacientes com adenocarcinoma gástrico e 55 amostras de tecido adjacente ao tumor. Foram construídos microarranjos de tecidos (TMA) e foi realizada imunomarcagem automatizada (GX Ventana - Roche®) para PD-1 e PD-L1. A imunorreatividade para PD-L1 em células tumorais foi observada em 8 casos (8,7%), sendo todos do tipo histológico intestinal de Láuren e estadiamento avançado, apresentando, em sua maioria o grau II de diferenciação. Enquanto que a imunorreatividade citoplasmática para PD-1 no linfócito do microambiente intratumoral (TIL) foi observada no citoplasma e ocorreu em 64 casos (69,6%), sendo a maioria do tipo histológico intestinal de Láuren, estadiamento avançado e grau II de diferenciação. Observou-se linfócitos intratumorais PD-1 positivos em maior número de casos, quando avaliados no estroma intratumoral, em comparação aos linfócitos PD-1 positivos em estroma do tecido adjacente ao tumor. Esses dados reforçam que pacientes com adenocarcinoma gástrico que apresenta as características histopatológicas encontradas em predominância para ambos os marcadores analisados, podem estar mais propensos a ativação da via PD-1/PD-L1, sendo candidatos elegíveis para utilizar terapia com anticorpos monoclonais anti-PD-1 ou anti-PD-L1.

Palavras-Chave: Adenocarcinoma gástrico; PD-1/PD-L1; Imunorreatividade.

ABSTRACT

IMMUNOPHENOTYPIC EXPRESSION OF PD-1 / PD-L1 IN GASTRIC ADENOCARCINOMA OF PATIENTS AT THE JOÃO DE BARROS BARRETO UNIVERSITY HOSPITAL

Gastric cancer is the third leading cause of cancer-related death in both genders, and at an advanced stage the prognosis has been unfavorable. Human tumors are prone to escape from immunovigilance, and one of the axes involved in this scenario is PD-1, a receptor expressed on the surface of cells, and its PD-L1 linker, which have already been detected in samples from gastric adenocarcinoma. This study aimed to characterize the immunophenotypic expression of PD-1 and PD-L1 proteins in tissue adjacent to the tumor, primary gastric adenocarcinoma tissue, associated with clinicopathological and demographic findings from patients attending at University Hospital João de Barros Barreto since 2008 to 2016. We selected 92 samples from patients with gastric adenocarcinoma and 55 tissue samples adjacent to the tumor. Tissue microarrays (TMA) were constructed and automated immunostaining was performed (GX Ventana - Roche ®) for PD-1 and PD-L1. The immunoreactivity for PD-L1 in tumor cells was observed in 8 cases (8.7%), all of them of intestinal histological type of Láuren and advanced staging, presenting, in the most, grade II of differentiation. Whereas cytoplasmic immunoreactivity for PD-1 in the lymphocyte of the intratumoral microenvironment (TIL) was observed in the cytoplasm and occurred in 64 cases (69.6%), being the majority of intestinal histological type of Láuren, advanced staging and grade II of differentiation. Intratumoral PD-1 positive lymphocytes were observed in a greater number of cases when evaluated intratumoral stroma, as compared to the tumor-associated PD-1 lymphocyte lymphocytes adjacent to the tumor. These data reinforce that patients with gastric adenocarcinoma who features the histopathological characteristics found in predominance for both markers analyzed, may be more likely to activate the PD-1 / PD-L1 pathway and are eligible candidates to use anti-PD-1 monoclonal antibody or anti- PD-L1.

Keywords: Gastric adenocarcinoma; PD-1 / PD-L1; Immunoreactivity.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Estimativa dos dez tipos de câncer mais incidentes para 2016 por gênero, no Brasil, exceto pele não melanoma.	21
Figura 2 - Estimativa dos dez tipos de câncer mais incidentes para 2016 por gênero, na Região Norte do Brasil, exceto pele não melanoma.	21
Figura 3 - Estimativa do número de casos e taxa bruta de incidência para 2016 por gênero, no Estado do Pará e sua Capital, Belém.	22
Figura 4 - O transporte através do sistema de secreção tipo IV de CagA.	27
Figura 5 – Os subtipos de Linfócito T CD4 naive e os seus respectivos fatores de transcrição e as citocinas típicas secretadas.	31
Figura 6 – As marcas do câncer, dentre elas a evasão a destruição pelo sistema imune.	33
Figura 7 – As etapas da imunoeedição no câncer.	35
Figura 8 – Interação de PD-1 com seus ligantes.	36
Figura 9 - Estrutura da proteína PD-1.	37
Figura 10 – Interações do Ligante 1 da proteína de morte programada 1.	39
Figura 11 – Mecanismo de inibição desencadeado pela interação PD-1/PD-L1 nas vias PI3K/Akt/ mTOR e Ras/MEK/Erk. APC: Célula Apresentadora de Antígeno; FAO: Oxidação de Ácidos Graxos; OCR: Taxa de Consumo de Oxigênio.	42
Figura 12 – Mecanismo de bloqueio da terapia utilizando anticorpo monoclonal, A) Anti-PD-1 que bloqueia interação entre PD-1 com PD-L1 e PD-L2, mas não impede a interação de PD-L1 com B7.1; e B) Anti-PD-L1 que age bloqueando a interação entre PD-L1 com PD-1 e B7.1, mas não impede a interação entre PD-1 e PD-L2.	54
Figura 13 - Esquema representativo da construção do bloco de TMA, através da retirada de cilindros de 1,5 mm de diâmetro dos blocos doadores e transferência dos mesmos para bloco receptor e marcação imunoistoquímica (A – Equipamento para construção de microarranjo, TMA GRAND MASTER; B- Transferência de área selecionada do bloco doador para o bloco receptor, formação do bloco com	63

microarranjo de TMA, ao qual é submetido à microtomia seriada, disposto em lâmina e corado pela técnica de HE; C- Um dos cortes histológicos obtidos é disposto em lâmina com carga, ao qual é identificada com etiqueta de acordo com protocolo de marcação imunohistoquímica cadastrado no aparelho GX automatizado Ventana (Roche®); D- As lâminas com etiqueta de identificação são colocadas no aparelho de imunohistoquímica, e ao fim do procedimento é obtida lâmina com marcação imunohistoquímica).

Figura 14 - Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal de Laurén com imunorreatividade nas células neoplásicas para PDL1 (A) Caso 1312-14 D (Positivo Forte; $\geq 50\%$; Escore 3) e (B) 3053-15 D (Positivo Fraco; $\geq 1\%$ - $\leq 10\%$; Escore 1). 75

Figura 15 - Ausência de imunorreatividade para PDL1 nas células neoplásicas do Adenocarcinoma gástrico (A) de tipo intestinal caso 1553-10 e (B) de tipo difuso caso 2066-09. 75

Figura 16 - Imunorreatividade para PD-1 em linfócitos intratumorais do adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal de Laurén, (A) caso 313-14 (Positivo Fraco; $\geq 1\%$ - $\leq 10\%$; Escore 1) (B) caso 2741-08 (Positivo Fraco; $\geq 1\%$ - $\leq 10\%$; Escore 1). 80

Figura 17 - Imunorreatividade para PD-1 em linfócitos intratumorais do adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal de Laurén, (A) caso 1043-10 (Positivo Forte; $\geq 25\%$ - $< 50\%$; Escore 3) e (B). caso 750-13 (Positivo Fraco; $\geq 1\%$ - $\leq 10\%$; Escore 1). 80

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 – Interpretação imunoistoquímica semi-quantitativa de PD-1 e PD-L1	66
Tabela 2 – Interpretação imunoistoquímica qualitativa (intensidade da coloração) de PD-1 e PD-L1	67
Tabela 3 – Estadiamento patológico do tumor gástrico primário (pT).	68
Tabela 4 – Estadiamento patológico de linfonodos regionais (pN)	68
Tabela 5 - Características epidemiológicas dos pacientes e histopatológicas dos adenocarcinomas gástricos e imunofenótipo PD-1/PD-L1.	71
Tabela 6- Distribuição dos casos PD-L1 em células neoplásicas e PD-1 em linfócitos no “microambiente intratumoral”	72
Tabela 7 - Distribuição dos casos de adenocarcinoma gástrico, aspectos epidemiológicos, histopatológicos e estadiamento patológico com imunofenótipo PD-1/PD-L1	74
Tabela 8 - Distribuição dos casos de adenocarcinoma gástrico, aspectos epidemiológicos, histopatológicos e estadiamento patológico com coexpressão de PD-1/PD-L1.	76
Tabela 9 – Imunorreatividade para PD-1 e aspectos epidemiológico, histopatológico e estadiamento de amostras de tecido adjacente ao adenocarcinoma gástrico	78
Tabela 10 - Distribuição comparativa da imunorreatividade para PD-1 entre linfócitos intratumorais e linfócitos do tecido adjacente ao adenocarcinoma gástrico	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT	Proteína Quinase B
Anti-PD-1	Anticorpo monoclonal anti proteína <i>program death 1</i>
Anti-PD-L1	Anticorpo monoclonal anti-Ligante 1 da proteína <i>program death 1</i>
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
BART	Transcritos à direita de <i>Bam-HI-A</i>
BCL-XL	Linfoma de Células B extra-grande
BRAF	Proto-oncogene Raf cinase do tipo B
BRAFV600E	Proto-oncogene Raf cinase do tipo B mutado com transversão da timina pela adenina no éxon 15 do gene BRAF, levando a substituição na proteína do aminoácido valina por glutamato
Cag-A	Proteína associada à citotoxina
Cag-PAI	Ilha de patogenicidade da proteína associada à citotoxina
CC1	Tampão à base de Tris
CCR7	Receptor de quimiocina do tipo 7
CD	Cluster of Differentiation
CDKs	Cinases dependentes de ciclina
CK2	Caseína quinase 2
CTLA-4	Proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico
DAG	Diacilglicerol
DFS	Sobrevida livre de progressão
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EBER	Pequeno RNA codificado pelo vírus Epstein- Barr
EBNA1	Antígeno nuclear 1 do vírus Epstein-Barr
EBV	Vírus Epstein Barr
EBVaGC	Vírus de Epstein-Barr associado ao carcinoma gástrico
EBVnGC	Vírus de Epstein-Barr não associado ao carcinoma gástrico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epitelial
EUA	Estados Unidos da América
FoxP3	Forkhead box P3

FAO	Oxidação de Ácidos Graxos
GMCSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
<i>H. Pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
H ⁺	Íon de hidrogênio
HIF-1	Fator indutor de hipóxia 1
HP	<i>Helicobacter pylori</i>
HUJBB	Hospital Universitário João de Barros Barreto
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICOS	Coestimulador induzido por linfócito T
IDO	Indoleamina dioxigenase
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IHQ	Imunoistoquímica
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP3	Inositol trifosfato
ITIM	Motivo inibidor do imunorreceptor baseado em tirosina
ITSM	Motivo de troca do imunorreceptor baseado em tirosina
JAK	<i>Janus Kinase</i>
JEG	Junção esôfago-gástrica
Kb	Kilobases
Kda	Kilodaltons
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
LCS	<i>Liquid Cover Slide</i>
LMP	proteína latente de membrana
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NFATc1	Fator nuclear de células T ativadas c1
NK	Célula <i>natural killer</i>
NKT	Linfócito T <i>natural killer</i>
OCR	Taxa de Consumo de Oxigênio

OMS	Organização Mundial de Saúde
ORR	Taxa de resposta objetiva
OS	Sobrevida global
Pb	Pares de base
PCK	Proteína quinase C
PD-1	Receptor de morte programada 1
<i>PDCD1</i>	Gene do receptor de morte programada 1
PD-L1	Ligante 1 do receptor de morte programada
PD-L2	Ligante 2 do receptor de morte programada
PFS	Sobrevida livre de progressão
pH	Potencial de hidrogênio
PIK3	Proteína quinase fosfatidilinositol 3
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol trifosfato
PLC- γ 1	Fosforilase gama 1
pTNM	Classificação patológica para tumor, linfonodos e metástase
PTEN	Homologo de fosfatase e tensina
Ptnm	Classificação de estadiamento de tumores malignos
RasGRP1	<i>RAS guanyl nucleotide-releasing protein 1</i>
RB	<i>Reaction Buffer</i>
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
SCF	Fator de célula tronco
SHP	Uma espécie de tirosina fosfatase
SKP2	Proteína cinase 2 associada a fase S
SSC	Tampão de cloreto de sódio e citrato de sódio
STAT	Proteínas transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição
T4SS	Sistema de secreção do tipo 4
T-bet	Fator de transcrição T-box
TCD4 ⁺	Linfócito T CD4 ativo
TCD8 ⁺	Linfócito T CD8 ativo
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCR	Receptor de célula T

Th/TH	Linfócito T helper
TIL	Infiltrado de Linfócitos T
TIM-3	<i>mucin domain 3</i>
TLRs	Receptores similares ao Toll
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
TRAF6	Fator 6 associado ao receptor de TNF
Treg	Linfócito T regulador
UFPA	Universidade Federal do Estado do Pará
Vac-A	Citotoxina vacuolizante
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
ZAP- 70	Cadeia Z associada a proteína quinase 70 (essencial na transdução da sinalização nos linfócitos T e células natural killer)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO NA LITERATURA.....	20
2.1 Considerações Gerais e Epidemiologia	20
2.2 Classificação Histopatológica e Carcinogênese.....	22
2.2.1 Dieta ingestão de alimentos ricos em sal.....	23
2.2.2 Ingestão de alimentos ricos em nitratos ou nitritos	24
2.2.3 Infecções por agentes patogênicos com tropismo pela mucosa gástrica.....	24
2.2.3.1 Infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	25
2.2.3.2 Vírus Epstein-Barr.....	28
2.3 Microambiente do Adenocarcinoma Gástrico	29
2.4 Sistema Imune Inato e Adaptativo Humoral e Celular.....	30
2.5 Sistema Imune e Câncer.....	32
2.5.1 Imunoedição no Câncer	33
2.5.2 Pontos de Controle do Sistema Imune.....	35
2.5.2.1 PD-1 (Programmed Death 1).....	36
2.5.2.2 PD-L1 e PD-L2	38
2.5.2.3 Mecanismo de Sinalização da Via PD-1/PD-L1.....	41
2.5.2.4 Efeitos da Sinalização da Via PD-1/PD-L1.....	42
2.5.2.5 Via PD-1/PD-L1 e o Ciclo Celular	43
2.5.2.6 Infecções e o Ponto de Controle do Sistema Imune	43
2.5.2.6.1 Via PD e infecção por <i>H.pylori</i>	45
2.5.2.6.2 Via PD e Infecção Por Vírus Epstein-Barr	47
2.6 Tratamento, Fatores Prognósticos e Preditivos e Sobrevida	49
2.6.1 Imunoterapia.....	52
2.6.2 Estudos do Bloqueio da Via PD-1/PD-L1 em Câncer Gástrico	53
3 APLICABILIDADE CLÍNICA.....	59
4 OBJETIVOS.....	60
4.1 Objetivo Geral	60
4.2 Objetivos Específicos.....	60
5 METODOLOGIA.....	61
5.1 Caráter do Estudo, Local e Amostragem.....	61
5.2 Aspectos Éticos.....	61

5.3 Critérios de Inclusão.....	61
5.4 Critérios de Exclusão	62
5.5 Histopatologia, Construção do Microarranjo do Tecido (TMA).....	62
5.6 Imunoistoquímica de PD-1 e PD-L1.....	64
5.7 Análise da Expressão de PD-1 e PD-L1	65
5.8 Gradação e Estadiamento Patológico	67
5.9 Análise Estatística.....	68
6 RESULTADOS	70
6.1 Características Epidemiológicas e Histopatológicas	70
6.2 Resultados das Expressões Imunoistoquímicas	72
6.2.1 Grupo de Pacientes com Adenocarcinoma Gástrico.....	72
6.2.2 PD-1 em Linfócitos intratumorais (TILs) e adjacente ao adenocarcinoma	77
7 DISCUSSÃO	81
8 CONCLUSÃO.....	86
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	87
REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

O câncer gástrico, apesar da redução de sua incidência, ainda é o quinto câncer mais comum e a terceira causa de morte relacionada ao câncer em homens e mulheres. Este tipo de câncer é mais prevalente em homens do que em mulheres, apresentando maiores índices entre a quinta e a sétima décadas de vida. Além disso, as taxas de mortalidade mais elevadas são no leste da Ásia, Europa Oriental, América Central e América do Sul, sendo a menor taxa encontrada na América do Norte (SOUZA *et al.*, 2013; FOCK, 2014; NICCOLAI *et al.*, 2015; GLOBOCAN., 2012; INCA, 2016).

As taxas de incidência e mortalidade do câncer gástrico ainda se apresentam em proximidade uma da outra, e a taxa de sobrevida no período de 5 anos é normalmente inferior a 20%, dados que de acordo com Souza *et al.*, (2013) podem ser justificados devido a detecção da doença ocorrer com maior frequência na fase tardia. Porém, vale ressaltar que nos países onde são adotados programas de rastreamento em nível populacional, ao qual o diagnóstico ocorre em estágio precoce em pelo menos 50% dos casos, as taxas de sobrevida no período de 5 anos são superiores a 80%.

No Brasil, a detecção precoce de câncer gástrico ainda é baixa, devido principalmente a fatores como a falta de especificidade do quadro clínico, a dificuldade de acesso aos serviços de saúde, assim como a concessão dos sintomas a outras doenças (SOUZA *et al.*, 2013).

No que concerne ao prognóstico e ao tratamento para esta doença, ambos são definidos conforme a localização, estadiamento tumoral, e número de linfonodos ressecados e acometidos. Muitos casos de câncer gástrico avançado tem apresentado prognóstico pouco favorável (ZILBERSTEIN *et al.*, 2013; ABDEL-RAHMAN, 2016).

Desse modo, muitos pesquisadores oncológicos tem mantido o foco na procura de novos e melhores tratamentos para esta doença. As terapias alternativas mais frequentemente estudadas tem focado nas vias moleculares como EGFR, VEGF, c-MET, IGF e atualmente, nos pontos de controle do sistema imunológico. A adoção de estudos voltados para os pontos de controle do sistema imunológico parte do conhecimento de que os tumores humanos tem propensão a ativá-los, afim de gerar uma regulação negativa da resposta imune, com o objetivo de escapar da imunovigilância, sendo o conjunto de etapas envolvidas nesse processo

nomeado como a imunoeedição no câncer (ABDEL-RAHMAN, 2016; GUILLEBON *et al*, 2015).

As terapias alternativas que tem sido projetadas para os pontos de controle do sistema imune são baseadas no uso de anticorpos monoclonais denominados “inibidores dos pontos de controle do sistema imune”, que atuam inibindo as moléculas regulatórias negativas com o objetivo de reestabelecer as respostas imunes antitumorais (GUILLEBON *et al*, 2015).

Um dos eixos do ponto de controle imunológico estudado, de acordo com pesquisas de Tamura *et al*, (2015) e Sabatier *et al* (2014), envolve o PD-1 que é um receptor expresso na superfície de linfócitos T e o seu ligante PD-L1, aos quais já foram detectados em vários tipos de câncer e a expressão de ambos foi relacionada a prognóstico desfavorável para o paciente, assim como as características patológicas e clínicas do tumor.

Testes de ensaios clínicos com fármacos anti-PD-1 e anti-PD-L1 tem sido realizados. Aos quais, tem sido observada a duração nas respostas para alguns tipos de câncer, como o câncer de pulmão e melanoma (SABATIER *et al*, 2014).

2 REVISÃO NA LITERATURA

2.1 Considerações Gerais e Epidemiologia

Mundialmente, de acordo com dados fornecidos pela GLOBOCAN em 2012, ocorreram 14,1 milhões de novos casos de câncer, assim como 8,4 milhões de mortes por câncer, sem contar com casos de câncer de pele não melanoma. Além disso, foi possível notar a maior prevalência em homens que em mulheres e maior taxa de mortalidade em países em desenvolvimento.

Quanto ao câncer gástrico, ainda de acordo com os dados da GLOBOCAN para o ano de 2012, foram estimados 952.000 novos casos, o que representa 6,8% do total, representando, o quinto tipo de câncer mais comum no mundo. Adicionalmente, a maior porcentagem de câncer de estômago (70%, o equivalente a 677.000 casos), ocorre em países em desenvolvimento, além do mais, nestes países, quando realizada análise separando por gêneros, é possível notar que há maior incidência no gênero masculino (456.000 casos) em relação ao gênero feminino (221.000 casos). No que concerne à taxa de mortalidade, este tipo de câncer ocupa a terceira colocação para ambos os gêneros, com 723.000 mortes que representa 8,8% do total de mortes relacionadas ao câncer.

No Brasil, de acordo com os dados do INCA (2016) para o período correspondente a 2016 e 2017 são estimados 295.200 e 300.870 novos casos de câncer para o gênero masculino e feminino, respectivamente, no país. Dentre estas taxas de estimativa, o câncer gástrico estará entre os mais prevalentes, ocupando o quinto lugar entre os homens com 12.920 novos casos (6%) e sexto entre as mulheres com 7.600 novos casos (3,7%) (Figura1).


Localização primária					Localização primária		
	casos novos	%				casos novos	%
			Homens	Mulheres	Mama Feminina	57.960	28,1%
Próstata	61.200	28,6%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Colo do Útero	16.340	7,9%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Estômago	12.920	6,0%			Estômago	7.600	3,7%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Corpo do Útero	6.950	3,4%
Esôfago	7.950	3,7%			Ovário	6.150	3,0%
Bexiga	7.200	3,4%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Laringe	6.360	3,0%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Leucemias	5.540	2,6%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%					

Figura 1 – Estimativa dos dez tipos de câncer mais incidentes para 2016 por gênero, no Brasil, exceto pele não melanoma. Fonte: Adaptado do INCA (2016).

Ainda de acordo com o INCA (2016) em análises divididas por regiões, pode-se observar que o câncer gástrico no Brasil possui incidência que varia conforme as regiões, mas ainda assim, se encontra entre a segunda e sexta colocação. Na região norte (Figura 2), o câncer gástrico no gênero masculino assumirá a segunda colocação, sendo estimados 970 novos casos (11,2%), enquanto que o gênero feminino assumirá a quarta posição, sendo estimados 480 novos casos (5,6%).


Localização primária					Localização primária		
	casos novos	%				casos novos	%
			Homens	Mulheres	Colo do Útero	1.970	23,1%
Próstata	2.470	28,6%			Mama Feminina	1.810	21,2%
Estômago	970	11,2%			Cólon e Reto	480	5,6%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	680	7,9%			Estômago	480	5,6%
Cólon e Reto	440	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	410	4,8%
Bexiga	370	4,3%			Glândula Tireoide	270	3,2%
Leucemias	310	3,6%			Leucemias	250	2,9%
Cavidade Oral	290	3,4%			Ovário	250	2,9%
Laringe	250	2,9%			Corpo do Útero	230	2,7%
Linfoma não Hodgkin	230	2,7%			Sistema Nervoso Central	190	2,2%
Sistema Nervoso Central	230	2,7%					

Figura 2 - Estimativa dos dez tipos de câncer mais incidentes para 2016 por gênero, na Região Norte do Brasil, exceto pele não melanoma. Fonte: Adaptado do INCA (2016).

Em relação ao Estado do Pará e sua capital, Belém, (Figura 3) de acordo com o INCA (2016), este tipo de câncer ocupará a sexta colocação em ambos os gêneros quando associada ao número de novos casos, tanto no Estado quanto na Capital. Para o gênero masculino são estimados 460 novos casos em todo o Estado, destes, 160 novos casos serão referentes à sua capital, Belém. Enquanto para o gênero feminino, são estimados 230 novos casos em todo o

Estado do Pará, destes, 100 novos casos serão referentes à Belém. Quanto à taxa bruta de incidência, calculada a cada 100 mil habitantes, o câncer gástrico no gênero masculino, ocupará a segunda colocação no Pará (11,38 casos a cada 100.000 habitantes) e na capital (22,54 casos a cada 100.000 habitantes). Enquanto que no gênero feminino, ocupará a terceira colocação no Pará (5,85 casos a cada 100.000 habitantes) e a quarta colocação na capital (12,71 casos a cada 100.000 habitantes).

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capital		Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	1.010	24,70	340	48,59	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	830	20,79	410	52,90
Colo do Útero	-	-	-	-	820	20,52	260	33,24
Traqueia, Brônquio e Pulmão	270	6,68	100	14,90	160	4,11	70	8,78
Cólon e Reto	190	4,79	80	11,13	230	5,84	120	15,38
Estômago	460	11,38	160	22,54	230	5,85	100	12,71
Cavidade Oral	130	3,12	50	6,51	80	1,93	20	3,11
Laringe	90	2,18	30	4,46	20	0,55	**	1,14
Bexiga	250	6,25	30	4,48	20	0,52	**	1,15
Esôfago	60	1,48	**	1,98	30	0,66	**	1,19
Ovário	-	-	-	-	110	2,73	60	7,52
Linfoma de Hodgkin	40	0,88	**	1,95	20	0,47	**	1,17
Linfoma não Hodgkin	90	2,21	30	4,50	70	1,67	30	4,17
Glândula Tireoide	20	0,61	**	1,96	110	2,75	40	5,28
Sistema Nervoso Central	80	1,93	30	4,07	70	1,69	30	3,53
Leucemias	140	3,41	40	5,53	120	3,03	40	4,90
Corpo do Útero	-	-	-	-	90	2,29	30	3,82
Pele Melanoma	20	0,59	**	1,46	30	0,71	**	1,42
Outras Localizações	760	18,65	260	37,32	650	16,19	250	31,48
Subtotal	3.610	88,84	1.190	169,83	3.690	92,32	1.510	193,38
Pele não Melanoma	1.090	26,88	350	50,40	810	20,22	240	31,05
Todas as Neoplasias	4.700	115,66	1.540	219,78	4.500	112,58	1.750	224,11

Figura 3 - Estimativa do número de casos e taxa bruta de incidência para 2016 por gênero, no Estado do Pará e sua Capital, Belém. Fonte: Adaptado do INCA (2016).

2.2 Classificação Histopatológica e Carcinogênese

A classificação de Laurén subdivide o câncer gástrico em dois tipos histológicos, o difuso e o intestinal (LAUREN, 1965). Para o tipo histológico intestinal, Pelayo e colaboradores (CORREA *et al.*, 1975) descreveram uma cascata de etapas sucessivas que compreendem mucosa gástrica normal, gastrite crônica, gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia, e então o adenocarcinoma gástrico invasivo. Em contrapartida, o adenocarcinoma gástrico do tipo difuso não apresenta lesão precursora. Estas diferenças entre os dois tipos histológicos e as características clínicas e patológicas sugerem que o desenvolvimento ocorre

através de rotas moleculares distintas (CORREA *et al.*, 1975; CARNEIRO *et al.* 2004; TAHARA *et al.* 2004; HUMAR *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2015).

Conforme o aspecto clínico, esta doença, normalmente apresenta-se em condições sequenciais que ocorrem em um período prolongado, como resultado de fatores genéticos e da exposição aos fatores ambientais, com geração de um fenótipo progressivamente regressivo, caracterizado pela substituição das células normais por aquelas que são encontradas normalmente no intestino (delgado e, posteriormente, grosso), no sentido inverso ao que ocorre no período de desenvolvimento fetal (BRITTO, 1997; CÉSAR *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2010).

No que se refere aos fatores de risco endógenos estes estão associados a doenças gástricas (como a gastrite autoimune atrófica) e a fatores genéticos. Enquanto que os fatores de risco exógenos estão associados ao estilo de vida (como a ingestão de alimentos ricos em sal, alimentos ricos em nitrato ou nitrito), além de infecções por microrganismos com tropismo pela mucosa gástrica que incluem a bactéria *Helicobacter pylori* e o vírus Epstein-Barr (D'ANGELO *et al.*, 2014).

2.2.1 Dieta ingestão de alimentos ricos em sal

O sal é considerado como um fator dietético que possui a capacidade de afetar a mucosa gástrica através da destruição da camada mucosa, promovendo a inflamação, erosão e a degeneração do epitélio, devido a sua atuação facilitadora para a ação de agentes genotóxicos. Esta afirmativa pôde ser demonstrada a partir de experimentos com ratos que haviam recebido dietas com alto teor de sal, as quais os resultados comprovaram que o sal é capaz de direcionar para a atrofia gástrica, estando correlacionado com a metaplasia. Adicionalmente, foi observado que o sal facilita a carcinogênese gástrica na presença de outros carcinógenos, através do aumento da absorção dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (CAPOFERRO e TORGENSEN, 1974; TATEMATSU *et al.*, 1975; KODAMA *et al.*, OHGAKI *et al.*, TAKAHASHI *et al.*, 1984; CORREA, 1988; BRITTO, 1997; FREITAS *et al.*, 2016).

2.2.2 Ingestão de alimentos ricos em nitratos ou nitritos

Os nitratos e nitritos são utilizados na conservação de alguns tipos de alimentos, como picles, salsichas e alguns tipos de enlatados. Ao serem ingeridos os nitratos são reduzidos a nitritos através da ação da flora bacteriana bucal e do trato digestivo. O nitrito formado posteriormente reage com aminas, amidas e outros precursores de nitrosação formando os compostos N-nitrosos, como a nitrosamina, que é um carcinógeno potencial do trato digestivo superior. Estes compostos formados associados ao aumento de radicais livres ocasionam lesão das células presentes na parede do estômago, diminuindo assim a produção de muco, ao qual possui função protetora do ambiente gástrico, induzindo a formação de células tumorais (BOGOVSKI e BOGOVSKI, 1981; GAROFÓLO *et al.*, 2004; BAÚ e HUTH, 2011; XIE *et al.*, 2016).

A ação dos compostos nitrogenados e metabólitos formados no organismo na indução de câncer gástrico, pode estar também ligada com a indução da inibição de vitamina C e de outros agentes antioxidantes aos quais exercem função protetora do DNA. Estas inibições podem favorecer a desaminação de purinas e pirimidinas do DNA, proporcionando a ocorrência de mutações (POREMBÁ *et al.*, 1995; KONO e HIROHATA, 1996; DE VITA *et al.*, WARD *et al.*, 1997; KODAMA *et al.*, 2003).

2.2.3 Infecções por agentes patogênicos com tropismo pela mucosa gástrica

Para muitas neoplasias malignas estão sendo consideradas possíveis associações com lesões e inflamações crônicas do tecido, ao qual podem ser atribuídas à infecções bacterianas, virais ou parasitárias. Destas neoplasias, estima-se que até 15% são causadas por infecções crônicas, que delineiam um ambiente propício para o processo de desenvolvimento tumoral, representando o equivalente a 1,2 milhões de casos a cada ano. Porém, apesar de tais dados, ainda estão sendo iniciadas pesquisas direcionadas para a descoberta e elucidação dos mecanismos envolvidos neste processo. Para o câncer gástrico são descritos na literatura dois agentes patogênicos que estão associados no processo de desenvolvimento desta neoplasia, a bactéria *Helicobacter pylori* e o vírus Epstein Barr (OTT e HODI, 2013; MURPHY e KELLY, 2015).

2.2.3.1 Infecção por *Helicobacter pylori*

A *Helicobacter pylori* (HP) que foi mencionada pela primeira vez por Marshall e Warren em 1983, trata-se de uma bactéria Gram negativa que coloniza o estômago, cuja morfologia é espiralada com extremidades arredondadas, apresentando cinco ou seis flagelos unipolares, que conferem a bactéria motilidade e facilitam a penetração no muco gástrico. Essa infecção por HP possui consequências clínicas que podem variar entre infecção gástrica, úlcera péptica e câncer gástrico em aproximadamente 50% da população global, pelo fato de tais consequências serem determinadas conforme as interações entre os fatores de virulência do HP, os elementos da mucosa gástrica e o ambiente (MARSHALL e WARREN, 1984; IARC, 1994; MITCHELL *et al.*, 2006; BESWICK *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2010; FEHLINGS *et al.*, 2012; OTT e HODI, 2013; LINA *et al.*, 2015 PUZZONI *et al.*, 2016).

Estudos epidemiológicos tem relatado indícios de correlação entre as condições de vida de uma população e a prevalência desta infecção, sendo observado que nos países em desenvolvimento, em torno de 50 a 90% dos habitantes são hospedeiros deste microrganismo, em contraste com os países desenvolvidos, ao qual prevalência é menos acentuada, o que sugere que a melhoria das condições de vida destas populações pode ter contribuído na prevenção da infecção (IARC, 1994; PARKIN *et al.*, 2001; FERRASI, 2007).

Além disso, estes mesmos estudos epidemiológicos que têm mostrado correlações entre o risco de câncer gástrico e a prevalência da infecção por essa bactéria, e sendo desse modo conferida uma importante função da infecção por HP no processo de carcinogênese gástrica. Visto isto, atualmente, a infecção por HP é enquadrada como carcinógeno de classe I, para o câncer gástrico, pela Organização Mundial da Saúde. Porém, ainda precisa ser elucidado quais os fatores do hospedeiro que predispoem a tal doença (IARC, 1994; MUÑOZ e FRANCESCHI, 1997; PEEK e BLASER, 2002; WELIN *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2010; TESTERMAN e MORRIS, 2014).

O *H. pylori* coloniza a mucosa gástrica humana com mínima competição por parte de outros microrganismos, adaptando-se a este meio com facilidade. A presença deste microrganismo no estômago está relacionada com dano epitelial e uma reação celular inflamatória de caráter misto (agudo e crônico) tanto na lâmina própria, quanto no epitélio

superficial. O antro pilórico é a área mais atingida pelo HP (STEVENS e LOWE, 1998; GANDINI, 2004; NIEDERLE e MOREIRA, 2010).

Para se adaptar ao ambiente gástrico, a bactéria secreta uma enzima fundamental à colonização, denominada urease, que é uma proteína que atua ajustando o pH do meio gástrico através da hidrólise da uréia presente em condições fisiológicas no suco gástrico e no fluido extracelular, gerando o bicarbonato e a amônia, aos quais tamponam a acidez gástrica. A amônia produzida age como receptor de íons H⁺, proporcionando um pH neutro no interior da bactéria, o que confere ao *H. pylori* resistência à acidez típica do ambiente gástrico, protegendo-a, até que esta atinja a camada de muco gástrico. A bactéria também secreta proteases e fosfolipases, que atuam degradando as glicoproteínas presentes na mucosa gástrica ocasionando danos nas células. Além disso, a bactéria se adere à membrana celular por meio de seus flagelos, desencadeando alterações nas células do lúmen, perda parcial ou total de microvilosidades e redução da quantidade de muco, tornando as células deprimidas e rugosas (CÉSAR *et al.*, 2002; MARSHALL, 2002; LADEIRA *et al.*, 2003; NIEDERLE e MOREIRA, 2010).

Estes mecanismos de ação do microrganismo na mucosa gástrica levam a esfoliação do epitélio, que gera um aumento da proliferação das células e alteração na produção de muco, que causa a perda da integridade e função protetiva da mucosa gástrica. Em acréscimo, no decorrer da resposta inflamatória do hospedeiro, ocorre a indução das interleucinas IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , além da ação de neutrófilos e macrófagos, as quais proporcionam também danos na superfície epitelial gástrica. Essas alterações em conjunto podem direcionar para a atrofia, metaplasia intestinal e adenocarcinoma. Porém, o resultado do conjunto de alterações na mucosa gástrica é dependente de fatores ligados com a fisiopatologia dessa doença, como os fatores de virulência da bactéria¹, fatores associados ao hospedeiro (susceptibilidade genética de cada indivíduo, resposta inflamatória², funcionamento da proteção antioxidante, a variação dos processos de reparo do DNA e o manejo da proliferação das células) fatores exógenos, como a dieta e tabagismo. Dessa forma, apesar da infecção por *H. pylori* ser um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer gástrico, apenas uma pequena quantidade de indivíduos infectados com a bactéria irá desenvolver a doença (ATHERTON, 1998; GO e CROWE, 2000; MONTECUCCO e RAPPUOLI, 2001; GONZALEZ *et al.*, 2002; FERRASI, 2007; POLK e PEEK, 2010).

¹ a virulência de cepas de HP que influenciam nos resultados clínicos da infecção.

² De acordo com o grau da resposta inflamatória será definida a manutenção, severidade e a resolução da infecção por HP.

As populações de HP são extremamente distintas entre si, devido a mutações pontuais, substituições, inserções e/ou deleções que ocorrem em seu genoma. Dessa forma, um único hospedeiro pode alojar várias cepas que, com o passar do tempo, podem sofrer mutações endógenas, rearranjos cromossômicos ou recombinações entre as cepas (ISRAEL e PEEK, 2001).

Em HP são conhecidos dois importantes fatores de virulência, a citotoxina vacuolizante (vacuolating cytotoxin, VacA), que é codificada pelo gene *VacA* e a proteína associada à citotoxina (cytotoxin-associated protein, CagA), codificada pelo gene *CagA* (COVER *et al.*, 1990; CÉSAR *et al.*, 2002; FERRASI, 2007; TESTERMAN e MORRIS, 2014).

O gene *cagA* integra uma ilha de patogenicidade que expressa proteínas do sistema de secreção tipo IV (Figura 4), que possuem a capacidade de transferir produtos bacterianos, como a proteína *cagA*, para o interior das células do hospedeiro, agindo também na indução da inflamação. O CagA está presente em aproximadamente 60 a 70% das cepas de HP e é associado ao risco de carcinoma, enquanto que contrariamente, sua ausência implica em um baixo risco para o desenvolvimento de adenocarcinomas difusos (COVER *et al.*, 1990; TUMMURU *et al.*, 1993; TUMMURU *et al.*, 1995; PARSONNET *et al.*, 1997; CÉSAR *et al.*, 2002; PEEK e BLASER 2002; WELIN *et al.*, 2003; TESTERMAN e MORRIS, 2014).

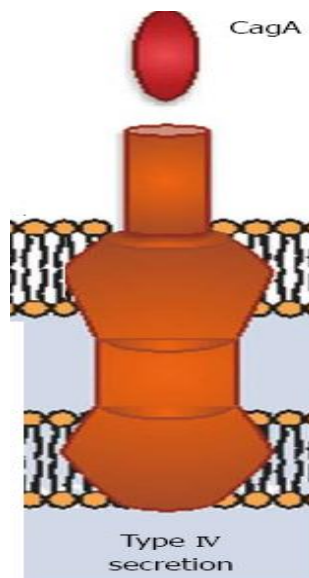


Figura 4 - O transporte através do sistema de secreção tipo IV de CagA. Fonte: Adaptado de TESTERMAN e MORRIS, 2014.

O segundo gene relacionado à virulência, o *vacA*, conduz para a formação de vacúolos em células do epitélio gástrico *in vitro* e está relacionado com a úlcera péptica. O *vacA* possui uma variação significativa entre as linhagens, que influencia na atividade vacuolizante da toxina. E isto pode explicar as variações das doenças entre pacientes infectados por HP. Existem duas regiões variáveis no gene *VacA*: uma região que é denominada *s*, onde é codificado um peptídeo de sinal, ao qual são identificados os tipos *s1* (com subtipos *s1a*, *s1b* e *s1c*) e *s2*, e uma região mediana do gene que possui os subtipos *m1* e *m2*. A combinação desses diferentes tipos alélicos (*s* e *m*) é um fator determinante para a produção e a especificidade da atividade da citotoxina e está ligada à patogenicidade bacteriana. Todas as linhagens possuem um dos tipos de sequência de sinal e um dos tipos da região mediana, sendo assim, é possível encontrar as variantes: *s1m1*, *s1m2*, *s2m2*. Destas variantes, as cepas do tipo *s1m1* produzem níveis elevados da toxina, o tipo *s1m2* produz níveis de moderados a baixos da toxina, enquanto que *s2m2* não são capazes de produzir citotoxina ativa (ATHERTON *et al.*, 1995, 1997; DOORN *et al.*, 1998; RUDI *et al.*, 1999; CÉSAR *et al.*, 2002; FERRASI, 2007; TESTERMAN e MORRIS, 2014).

2.2.3.2 *Vírus Epstein-Barr*

O vírus *Epstein-barr* (EBV) é um herpesvírus ubíquo humano que possui atividade oncogênica, podendo ser detectado o genoma do vírus em células de origem linfóide e em células de origem epitelial (IIZASA *et al.*, 2012; DONG *et al.*, 2016).

Primeiramente o EBV se difunde pela via oral, e após a infecção primária, o EBV estabelece a chamada infecção latente em linfócitos B, onde expressa um conjunto limitado de genes virais necessários para a manutenção do epissoma viral, conferindo dessa forma uma vantagem de sobrevivência para a célula infectada. Apesar do EBV exibir característico tropismo por linfócitos B, é capaz de infectar a mucosa gástrica. Acredita-se que um microambiente inflamatório com danos ao epitélio gástrico, induzido por fatores ambientais e/ou infecção por *H.pylori* desencadeie a infiltração de linfócitos B infectados com EBV e linfócitos T na mucosa gástrica. As células epiteliais do estômago que apresentam danos podem ser então infectadas a partir do contato com linfócitos B

infectados com EBV reativados (a partir da infecção latente para a replicativa) (RICKINSON e KIEFF, 2007; MURPHY *et al.*, 2009; IIZASA *et al.*, 2012; ABE *et al.*, 2015).

No estudo de Murphy e colaboradores (2009), em amostras de adenocarcinoma gástrico, foi observado um achado interessante quanto a localização tumoral e infecção por EBV. Adenocarcinomas gástricos com localização na cardia e/ou corpo possuíam probabilidade duas vezes maior de serem EBV positivos quando comparados com tumores localizados no antro.

O EBV pode promover as fases iniciais da carcinogênese gástrica através da indução da proliferação monoclonal de células infectadas persistentemente pelo vírus. Acredita-se que os carcinomas gástricos associados ao EBV representem cerca de 10% de todos os carcinomas gástricos em todo o mundo. (MURPHY *et al.*, 2009; IIZASA *et al.*, 2012; SHINOZAKI-USHIKU *et al.*, 2015).

Existem três perfis de genes de latência, porém em carcinoma gástrico associado ao EBV, são expressos apenas os perfis de latência do tipo 1 e 2. As quais são caracterizados pela expressão do antígeno nuclear EBV-1 (EBNA1), do pequeno RNA codificante EBV-1 e 2 (EBER1 e 2), (BART) e a proteína latente de membrana do tipo 2 (LMP2A) (IIZASA *et al.*, 2012; SHINOZAKI-USHIKU *et al.*, 2015).

2.3 Microambiente do Adenocarcinoma Gástrico

No microambiente do adenocarcinoma gástrico, além das células neoplásicas, há também a presença de grupos de células do estroma, do sistema imune, fibroblastos e células vasculares, as quais desempenham funções importantes no desenvolvimento, progressão e agressividade da doença. As células estromais além de estarem associadas com um prognóstico negativo, parecem estar envolvidas em funções como, a manutenção de uma matriz extracelular adequada para garantir o crescimento de células cancerígenas, e a secreção de moléculas estimuladoras de crescimento (WU *et al.*, 2012; QUAIL e JOYCE, 2013; BUSUTTIL *et al.*, 2014).

Outros grupos de células presentes no microambiente tumoral e essenciais para o desenvolvimento do câncer gástrico são as células relacionadas à regulação da vascularização e imunidade. Em cânceres gástricos há relatos de secreção de componentes estimuladores da angiogênese, que viabilizam a formação de vasos sanguíneos, garantindo aporte nutritivo para

as células tumorais. E por fim, existem as células do sistema imune que dependendo de identidade podem exercer função pro ou anti-tumorigênica (QUAIL e JOYCE, 2013; TAN e YEOH, 2015).

2.4 Sistema Imune Inato e Adaptativo Humoral e Celular

A principal função do sistema imune é o reconhecimento e eliminação de antígenos estranhos, formação de memória imunológica e desenvolvimento da capacidade de tolerar antígenos próprios. Este sistema é composto pelo sistema imune inato e adaptativo (LUCKHEERAM *et al.*, 2012).

O sistema imune inato é a linha de defesa inicial do hospedeiro contra patógenos, constituído por barreiras físicas (pele e mucosas), fagócitos mononucleares (monócitos e macrófagos), granulócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), mastócitos, células dendríticas, células *Natural Killer* (NK), plaquetas e moléculas solúveis (complemento, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas) (AKIRA *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2007; CRUVINEL *et al.*, 2010; TURVEY e BROIDE, 2010; GONÇALVES, 2014).

O sistema imune adaptativo apresenta duas populações de linfócitos (Linfócitos T e B), os quais são produzidos na medula óssea, divergindo quanto ao local de maturação e forma de atuação. Os linfócitos T sofrem maturação no timo e atuam estabelecendo a imunidade celular, enquanto os linfócitos B tem maturação na medula óssea e atuam, mediando a resposta humoral. Em conjunto, ambos, estabelecem a imunidade adaptativa e colaboram com a ação do sistema imune inato (LUCKHEERAM *et al.*, 2012; TERRA *et al.*, 2012; GONÇALVES, 2014).

Os linfócitos T, após migrarem da medula óssea até o timo, passam por processo de maturação e diferenciação. A diferenciação pode ser em linfócitos TCD4+ e TCD8+, sendo tal determinada conforme os receptores expressos. Posteriormente, estes linfócitos são submetidos à seleção de acordo com a capacidade não reativa à antígenos próprios, ou seja, de acordo com a capacidade de reconhecer e tolerar o que é próprio (GAMEIRO *et al.*, 2010; TERRA *et al.*, 2012).

De acordo com o tipo de linfócitos T, ao qual se diferenciam, exercem uma função. Os linfócitos T CD4+ desempenham a função de influenciar na resposta imune, e para tanto atuam produzindo e liberando citocinas. Os linfócitos T CD4 *naive* são subdivididos em T

helper 1 (Th1), *T helper 2* (Th2), *T helper 17* (Th17) e *T reguladores* (Treg), sendo o processo de diferenciação de todos os subtipos de linfócito TCD4 *naive* mediado conforme estímulos de citocinas e expressão do fator de transcrição, ao qual é diferente conforme o subtipo (Figura 5). Os linfócitos *T helper 1* possuem como fator de transcrição o Tbet, e são responsáveis principalmente por secretarem IFN- γ e IL-1, sendo essenciais para a progressão da resposta inflamatória e imune, assim como na ativação de macrófagos. Os linfócitos *T helper 2* possuem como fator de transcrição o GATA3, e atuam secretando IL-4, IL-5 e IL-13, sendo esse subtipo correlacionado com a resposta imune humoral e com o controle de infecções extracelulares. Os linfócitos *T helper 17* possuem como fator de transcrição o ROR γ t, e atuam secretando IL-17, IL-21 e IL-22, sendo esse subtipo associado com a montagem de uma resposta imune contra bactérias extracelulares e fungos, além disso, estes linfócitos estão envolvidos em reações autoimunes. E finalmente, os linfócitos *T reguladores* aos quais apresentam como fator de transcrição o FOXP3, e são responsáveis pela secreção de TGF- β e IL-10, assim como na modulação, controle e finalização da resposta imune, visto que atuam na supressão das células T. Os linfócitos T CD8+ atuam na destruição direta e indução da apoptose das células infectadas/danosas (LUCKHEERAM *et al.*, 2012; TERRA *et al.*, 2012; NORMANTION e MARTI, 2013).

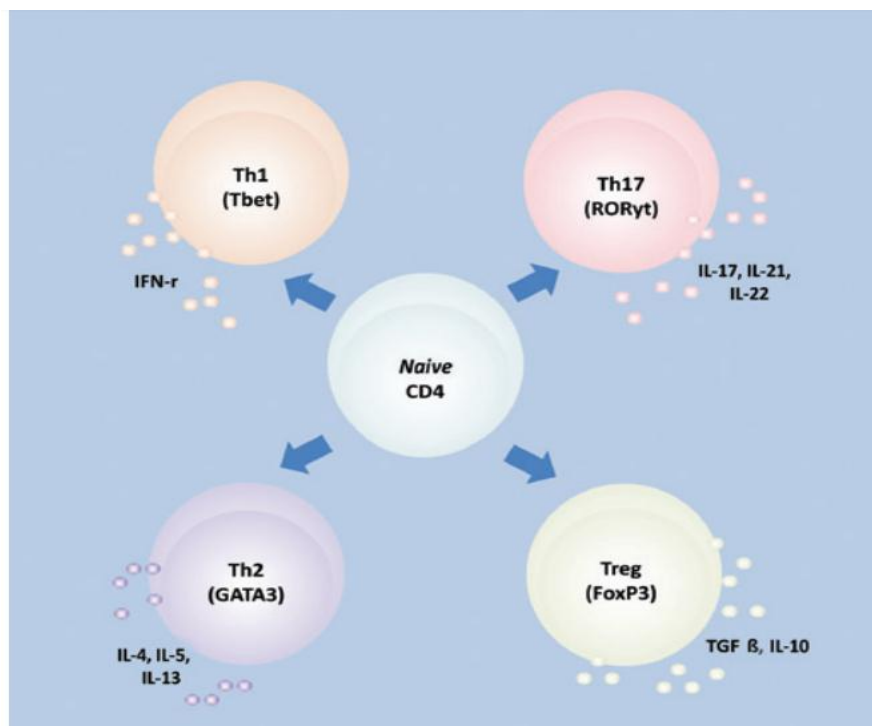


Figura 5 – Os subtipos de Linfócito T CD4 *naive* e os seus respectivos fatores de transcrição e as citocinas típicas secretadas. Fonte: NORMANTON e MARTI, 2013.

Esses linfócitos T, após maturação no timo, circulam no sangue para os tecidos periféricos, e somente são ativados, tornando-se células efetoras, quando reconhecem um antígeno por meio da interação entre o receptor de células T (TCR) com o antígeno ligado ao MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade), que é apresentado por uma célula apresentadora de antígeno (células dendríticas, linfócitos B, macrófagos), recebendo assim, sinais coestimulatórios da interação do CD28 (linfócito T) com moléculas coestimulatórias (B7.1, B7.2), promovendo desta forma a produção de citocinas e a proliferação de linfócitos T e (ARUFFO e SEED, 1987; LARSEN *et al*, 1994; BADOUAL *et al*, 2013; KEDMI *et al*, 2014).

Os linfócitos B imaturos que são produzidos e maturados na medula óssea, posteriormente migram para o baço e outros órgão linfóides secundários. Os linfócitos B possuem a capacidade de atuar, produzindo e liberando anticorpos específicos que ao atingir a circulação sanguínea, podem se deslocar para os tecidos periféricos nas quais atuam, neutralizando os microrganismos ou toxinas por ligação a tais, ativando proteínas do sistema complemento no plasma para então viabilizar a destruição de patógenos por fagócitos. Os linfócitos B podem também atuar como células apresentadoras de antígenos (LI *et al*, 2007; LEBIEN e TEDDER, 2008; TERRA *et al.*, 2012).

2.5 Sistema Imune e Câncer

O câncer humano é constituído por várias modificações genéticas e epigenéticas que desencadeiam a formação de novos antígenos os quais podem ser reconhecidos e eliminados pelo sistema imunológico, antes de tornarem-se clinicamente evidentes. Esta observação de que o sistema imunológico é direcionado para a detecção e eliminação de células malignas foi desenvolvido inicialmente por Burnet e Thomas, sendo conceituada como vigilância imunológica do câncer. Porém, apesar desta observação, diversos dados posteriores sugeriram que as células da resposta imune inata e as células da resposta imune adaptativa podem também exercer uma função importante no processo da carcinogênese. Desta forma, mesmo que haja uma resposta imune do hospedeiro contra o desenvolvimento tumoral, a ação imune pode ser ineficaz, devido a estes delinarem vários mecanismos de resistência, aos quais podem ser incluídos locais de imunossupressão, indução da tolerância e disfunção sistêmica

na sinalização de células. Esta observação de que o sistema imune atua detendo o desenvolvimento tumoral, mas que pode conforme a interação com o tumor delinear um ambiente predisponente para o desenvolvimento do mesmo conduziu para a aplicação do conceito ‘imunoeedição no câncer’ (BURNET, 1957; DUNN *et al*, 2002; HANAHAN e WEINBERG, 2011; TOPALIAN *et al*, 2012; LEE *et al*, 2014).

2.5.1 Imunoeedição no Câncer

Em condições normais, para evitar a autoimunidade e permitir a tolerância periférica, ou regulação negativa das células imunitárias afim de promover a homeostasia imunológica, vários pontos de controle do sistema imune devem ser cruzados, visando garantir que a resposta imune possa ocorrer e durar. Para o escape da vigilância imunológica, uma das marcas do câncer (figura 6), os tumores humanos podem ativar os pontos de controle do sistema imune e este processo interativo entre o tumor e o sistema imune é denominado imunoeedição (DUNN *et al*, 2002; GUILLEBON *et al*, 2015).

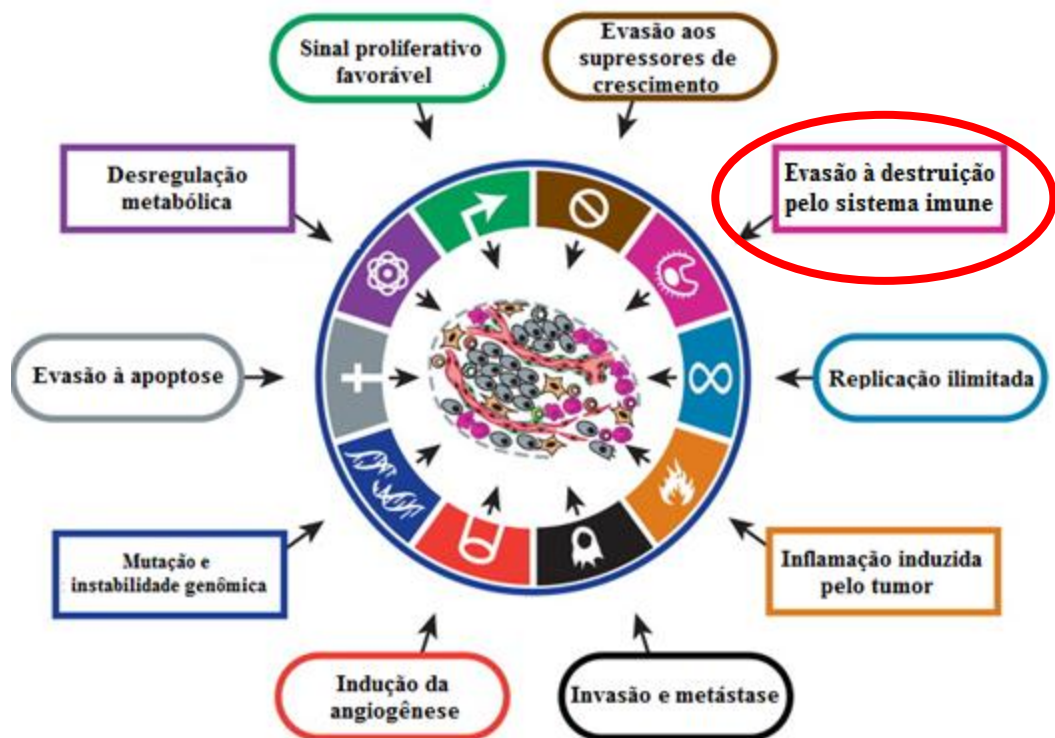


Figura 6 – As marcas do câncer, dentre elas a evasão a destruição pelo sistema imune. Fonte: Adaptado de HANAHAN e WEINBERG, 2011.

A imunoeedição no câncer presume que o sistema imunológico tem a capacidade de detectar e eliminar grande parte dos tumores ainda em estado precoce. Entretanto, alguns tumores podem não ser completamente eliminados, visto que conseguem atingir um equilíbrio entre o seu crescimento e a destruição pelo sistema imune, o que pode ocorrer em um período longo, até que o tumor adquira a capacidade de escapar da vigilância imune e se desenvolver, quando então será detectado clinicamente (MITTAL *et al*, 2014; ROTHSCILD *et al*, 2015).

A imunoeedição no câncer é definida por três “E” que correspondem a: eliminação, equilíbrio e escape (Figura 7). A primeira fase corresponde ao período ao qual a imunovigilância é ativa e capaz de eliminar as células tumorais, sendo principalmente mediada por linfócitos específicos para o antígeno associado ao tumor. Nesta fase, as células tumorais são reconhecidas por células da resposta imune inata e adaptativa, e eliminadas antes de se tornarem uma doença maligna detectável clinicamente, porém células tumorais esporádicas podem surgir e então são mantidas na segunda fase. A segunda fase, a fase de equilíbrio, é a mais longa das três fases (pode durar meses, anos ou a vida inteira do hospedeiro) e corresponde ao período em que o crescimento do tumor ainda é inviabilizado pelo sistema imunológico do hospedeiro. Nesta fase, o IFN- γ e a IL-12 produzidos e liberados pelos linfócitos T CD8+ e células dendríticas, auxiliam através da capacidade de levarem as células tumorais a um estado de inércia funcional. Porém, no decorrer da fase de equilíbrio, as células tumorais com maior instabilidade genética podem sobreviver e adquirir resistência, ou seja, a ação continuada do sistema imunológico pode promover uma seleção darwiniana de variantes de células tumorais resistentes ao ataque imune, processo que é denominado de imunoseleção. A partir do momento em que estas variantes resistentes surgem, se encaminham para a fase de escape. A fase de escape corresponde ao crescimento do tumor, mesmo que haja um ambiente imunologicamente intacto, devido às células tumorais adquirirem um perfil pouco imunogênico capaz promover um microambiente de caráter imunossupressor (indução da expressão de linfócitos T reguladores, células supressoras derivadas da mielóide, expressão de pontos de controle do sistema imune na superfície de células tumorais, como o PD-L1), o qual garante as mesmas a resistência e sobrevivência a ação sistema imune (DUNN *et al*, 2002; MITTAL *et al*, 2014; GUILLEBON *et al*, 2015).

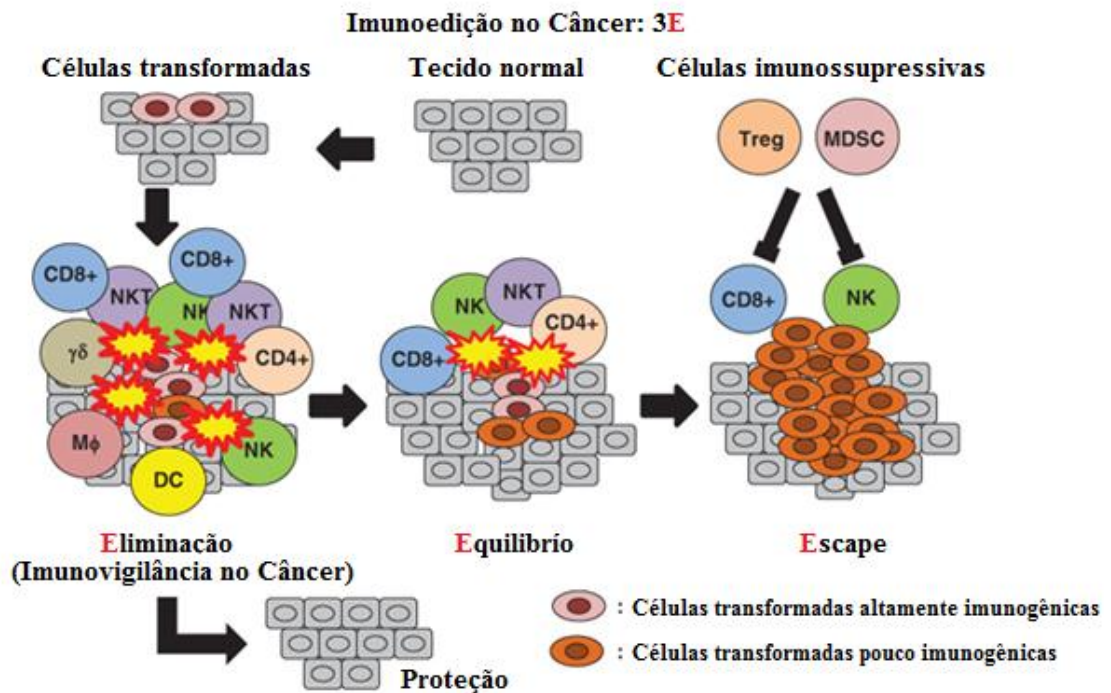


Figura 7 – As etapas da imunoedição no câncer. Fonte: Adaptado de SAKAKURA e CHIKAMATSU, 2013.

2.5.2 Pontos de Controle do Sistema Imune

Os linfócitos T antes de serem liberados no timo, passam por um processo de seleção negativa, onde os linfócitos T autorreativos não são liberados, porém, apesar disso, eventualmente pode ocorrer a liberação deste tipo de linfócito na circulação. Na circulação, estes linfócitos autorreativos podem reconhecer autoantígenos no tecido periférico e desta forma desencadear uma resposta autoimune. Para evitar a ocorrência dessas respostas imunes direcionadas para tecidos próprios, o organismo possui os denominados pontos de controle do sistema imune, como por exemplo as vias de inibição CTLA-4 e PD-1. Porém, apesar dessas vias inibitórias representarem um mecanismo importante para a manutenção da autotolerância periférica, elas podem ser um dos mecanismos que os tumores podem utilizar para evadirem da destruição imune, através da expressão de ligantes de receptores inibitórios do ponto de controle do sistema imune que atuam encerrando a ativação da resposta imunológica após contato com o antígeno, dentro do microambiente tumoral (CHEN, 2004; KEIR *et al*, 2006, 2008; FLEMMING, 2012; TOPALIAN *et al*, 2012; SZNOL e CHEN, 2013; PUZZONI *et al.*, 2016; ALVES e GUEDES, 2016).

2.5.2.1 PD-1 (*Programmed Death 1*)

O receptor de morte programada 1 (PD-1;CD279) que foi identificado primeiramente em um hibridoma³ de linfócitos T submetidos à apoptose, é uma molécula de superfície que juntamente com seus ligantes, PD-L1 e PD-L2 (Figura 8), exerce um papel como ponto de controle do sistema imune, inibindo a função de linfócitos T nos tecidos (ISHIDA *et al*, 1992; FREEMAN *et al*, 2000; LATCHMAN *et al*, TSENG *et al*, 2001; FRANCISCO *et al*, 2010; SZNOL e CHEN, 2013; GUILLEBON *et al.*, 2015).

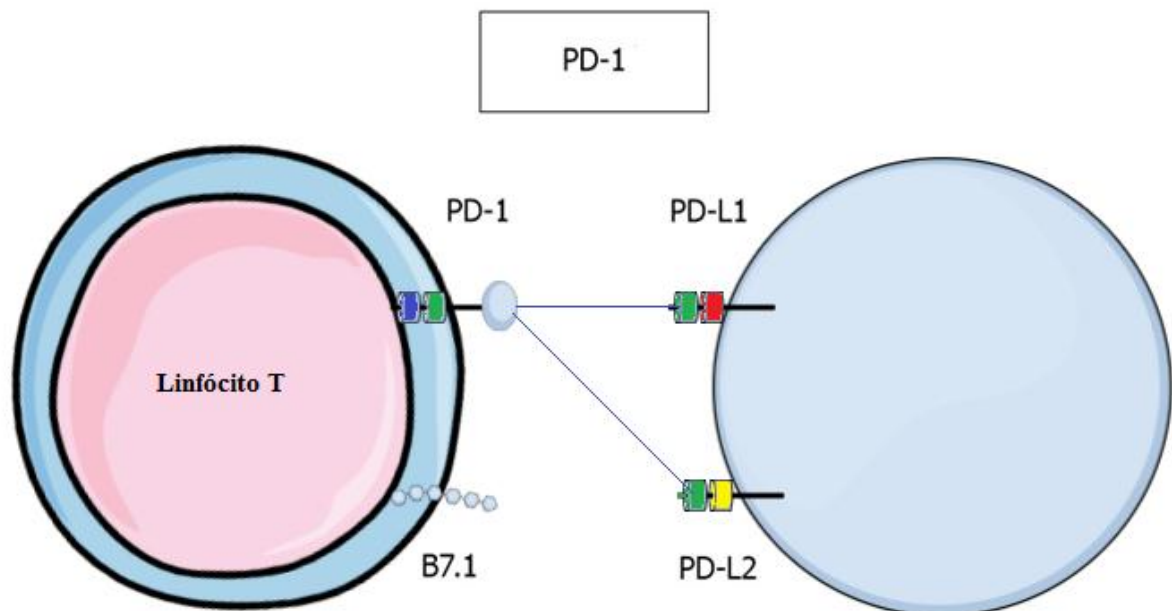


Figura 8 – Interação de PD-1 com seus ligantes. Fonte: Adaptado de GUILLEBON *et al.*, 2015.

O gene *PDCD1* que está localizado no cromossomo 2 (2q37), pertence a superfamília de genes de imunoglobulina, e codifica a proteína PD-1, um tipo de proteína transmembranar I que contém 288 aminoácidos, e aproximadamente 50-55 Kda. No que concerne à sua estrutura, a PD-1 apresenta um domínio extracelular IgV seguido por uma região transmembranar e uma cauda citoplasmática (Figura 9), partilhando de cerca de 21-33% de identidade de sequência de aminoácidos com CTLA-4, CD28 e ICOS. A cauda na região citoplasmática possui dois motivos de sinalização baseados em tirosina, que são: o

³ Linhagens celulares que são projetadas com a finalidade de se produzir determinado anticorpo monoclonal.

motivo inibidor do imunorreceptor baseado em tirosina (ITIM), localizado próximo à membrana plasmática, e o motivo de troca do imunorreceptor baseado em tirosina (ITSM), localizado distalmente à membrana plasmática. O ITIM de PD-1 medeia sinais inibidores, enquanto o motivo ITSM atua na sinalização após a ligação de PD-1, recrutando SHP1 e SHP2 fosfatase com a finalidade de induzir a ativação reversa dos eventos de fosforilação (ISHIDA *et al*, 1992; OKAZAKI *et al.*,2001; CHEMNITZ *et al*, 2004; OKAZAKI e HONJO, 2007; KINTER *et al*, 2008; RILEY, 2009; YAO *et al.*, 2013; KEDMI *et al*, 2014; BARDAN *et al.*, 2016).

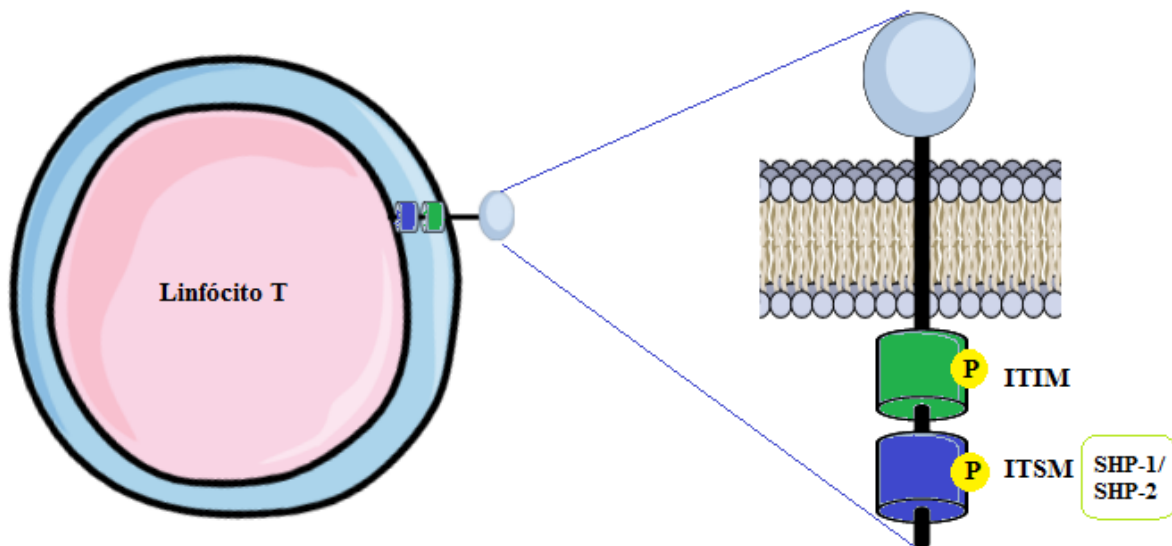


Figura 9 - Estrutura da proteína PD-1. Fonte: Adaptado de FRANCISCO *et al*, 2010.

A PD-1 é expressa em linfócitos T, linfócitos B, linfócitos T *Natural Killer* (NKT), células NK, monócitos e alguns subgrupos de células dendríticas, após serem ativados (KINTER *et al*, 2008; OESTREICH *et al.*, 2008; FRANCISCO *et al*, 2010; BARDAN *et al.*, 2016). A indução da expressão de PD-1 em linfócitos T, de acordo com estudo de Polanczyk *et al*, (2006) e Kinter *et al*, (2008) parece ser potencialmente induzida por citocinas de cadeia γ comum que tem ação importante na indução da expressão e sobrevivência de linfócitos T, como a IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21, assim como TLRs, interferons e estrógeno (em linfócitos T e APCs). A expressão do PD-1 é em parte mediada pelo recrutamento do fator nuclear de células T ativadas c1 (NFATc1) para o núcleo. Para frisar a importância deste fator, um estudo realizado por Oestreich e colaboradores (2008), utilizando inibidor de NFATc1,

mostraram que a inibição de NFATc1 foi acompanhada por uma redução da expressão de PD-1, o que de fato confirmou que o NFATc1 exerce uma função importante para a expressão de PD-1.

2.5.2.2 PD-L1 e PD-L2

O PD-1 tem dois ligantes PD-L1 (B7-H1; CD274) e PD-L2 (B7-DC; CD273), cujos genes estão todos localizados no cromossomo 9p24.1. Os ligantes PD-L1 e PD-L2 que foram identificados como pertencentes da família B7 em 1999 e 2001, respectivamente, são proteínas transmembranares do Tipo I que possuem domínios extracelulares Ig-V e Ig-C e um domínio intracelular curto, ambos apresentando entre si 40% de identidade na sequência de aminoácidos. O PD-L1 e PD-L2 diferem nas suas afinidades para PD-1. O PD-L2 tem uma afinidade de três vezes mais elevada para PD-1 em comparação ao PD-L1. A expressão de ambos os ligantes de PD-1 são reguladas por estímulos inflamatórios (DONG *et al*, 1999; FREEMAN *et al*, 2000; LATCHAMAN *et al*, 2001; TSENG *et al*, 2001; BUTTE *et al*, 2007; FRANCISCO *et al*, 2010; SZNOL e CHEN, 2013; ROEMER *et al*, 2016).

O PD-L1 em humanos é expresso em mastócitos, macrófagos, linfócitos B, linfócitos T, células endoteliais, vasculares, epiteliais, musculares, hepatócitos, células da placenta, células das ilhas pancreáticas, astrócitos e neurônios. Estudos, utilizando técnica imunistoquímica tem revelado que o PD-L1 não é expresso por tecidos epiteliais, nódulos linfáticos e por plasmócitos normais; mas é expresso constitutivamente em vários tumores humanos, células de linfoma e de mieloma. O que pode representar uma resposta adaptativa adotada por células tumorais para resistir ao ataque imune. A expressão desse ligando é regulada potencialmente por interferon- α , β e γ (IFN- α , β e γ), lipopolissacarídeos bacterianos, fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos, fator de crescimento vascular endotelial, e as citocinas interleucina-4 (IL-4) e interleucina- 10 (IL-10). O PD-L1 pode também agir como ligante para a molécula B7-1 (CD80) (Figura 10), ligando assim a via PD-1/ PD-L1 com a via B7-1/CD28/CTLA-4 (FREEMAN *et al*, 2000; EPPHIMER *et al*, 2009; YAMAZAKI *et al*, 2002; BUTTE *et al* 2007; FRANCISCO *et al*, 2010; HINO *et al*, 2010; SZNOL e CHEN, 2013; GUILLEBON *et al.*, 2015).

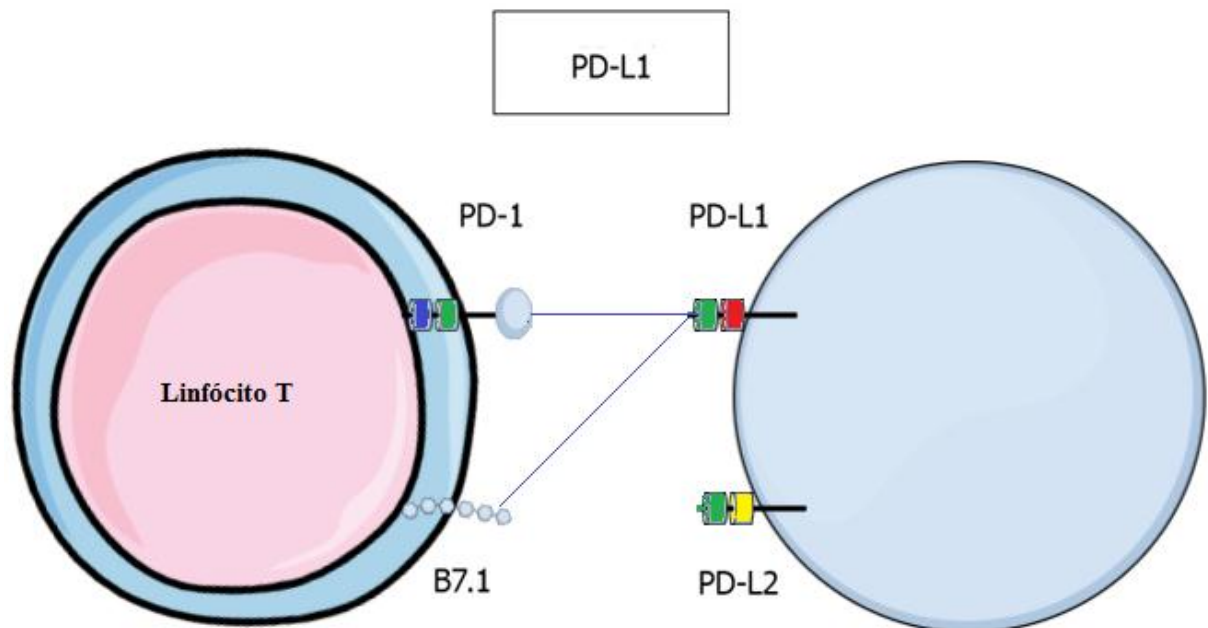


Figura 10 – Interações do Ligante 1 da proteína de morte programada 1. Fonte: Adaptado de GUILLEBON *et al.*, 2015.

O PD-L1 pode ser expresso tanto de forma constitutiva, quando indutiva por estímulos inflamatórios locais, como por exemplo, os interferons. A indução da expressão de PD-L1 através de inflamação local, denominada como resistência imunitária adaptativa, necessita inicialmente da presença de um infiltrado de linfócitos TCD8⁺ no microambiente tumoral. Estes linfócitos T inicialmente reconhecem os antígenos tumorais através de receptores de células T, desencadeando a ativação inicial, a expressão de PD-1 e a produção de interferons locais, gerando uma resposta antitumoral inicial. Porém, os interferons produzidos agem na indução da expressão de PD-L1 em células do tumor, o que conduz a supressão da resposta imunológica, através da inibição da ativação de linfócitos T (CHEMNITZ *et al*, 2004; KEIR *et al*, 2006; FRANCISCO *et al*, 2010; RIBAS, 2012).

A expressão de Interferon- γ , um regulador positivo da expressão de PD-L1, tem sua sinalização mediada por *Janus* quinase (JAK)/STAT, que por sua vez tem sua ativação desencadeada por proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e PIK3/AKT. Desta forma, as vias de sinalização JAK/STAT e MAPK estão envolvidas na expressão de PD-L1 induzida por IFN- γ (FREEMAN *et al*, 2000; FRANCISCO *et al*, 2010).

Em estudo de Liu e colaboradores (2007), utilizando inibidores específicos em linhagens de células de mieloma múltiplo para componentes de vias relacionadas com a indução de interferon- γ , como o fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88), o receptor do fator de necrose tumoral associado ao fator 6 (TRAF6), e MEK, observaram que o bloqueio destes desencadeou a inibição da expressão de PD-L1 induzida por interferon- γ . Os dados deste estudo reforçam a importância do IFN- γ na indução da expressão do PD-L1.

Dados de estudos *in vitro* sugeriram que após a interação entre PD-1 e PD-L1, este ligante induz a fosforilação de ITIM e ITSM, o que resulta na inibição da via PI3K/AKT, redução da proliferação linfocitária mediada por TCR e da secreção de interferon- γ , e aumento da apoptose de células T. No estudo de Parsa e colaboradores (2006), utilizando linhagem de células de glioma, foi observado que a perda ou a inibição do homólogo de fosfatase e tensina (PTEN), uma fosfatase celular que modifica a sinalização de quinase fosfatidilinositol 3 (PI3K) e AKT, aumenta a expressão pós-transcricional de PD-L1. Além disso, notou-se que a inibição da via PI3K ou AKT diminuiu PD-L1 nestas células tumorais, talvez devido o bloqueio destas vias interferir na indução da expressão de IFN- γ , que é um indutor potencial da expressão de PD-L1.

O PD-L2 é expresso de forma mais restrita, sendo regulado positivamente em células dendríticas, macrófagos e mastócitos, subgrupo de linfócitos B de centro germinativo, em células endoteliais, vasculares e linfócitos T. É regulado por IL-4, GM-CSF, e em menor grau por IFN- γ (LATCHMAN *et al*, 2001; YAMAZAKI *et al*, 2002; FRANCISCO *et al*, 2010; KEDMI *et al*, 2014).

Dados de estudos em melanoma apontam que BRAF V600E é capaz de induzir a expressão de PD-L1 e PD-L2 por fibroblastos no microambiente tumoral através de uma via dependente de IL-1 (BASTMAN *et al.*, 2016).

Bastman e colaboradores (2016), avaliaram em seu estudo a expressão de linfócitos T CD4 e T CD8, PD-1, PD-L1 e PD-L2 em amostras de câncer primário de tireóide, sendo observada elevada positividade para PD-1 em linfócitos T CD4 e T CD8. Adicionalmente, neste tipo de câncer, a expressão de PD-L1 foi encontrada em linfócitos intratumorais e peritumorais, sendo elevada a sua expressão em casos com metástases em linfonodos regionais. Outro dado obtido foi a expressão de PD-L1 e PD-L2, tanto em células tumorais, quanto em leucócitos associados, em tumores primários pT4 e metastáticos.

2.5.2.3 Mecanismo de Sinalização da Via PD-1/PD-L1

A ligação de PD-1 à PD-L1, juntamente com a estimulação de TCR, desencadeia a fosforilação dos motivos baseados em tirosina presentes na cauda citoplasmática do PD-1, ITIM e ITSM, aos quais recrutam SHP-1 e SHP-2, que por sua vez prejudicam a atividade de duas cascatas de sinalização proximais à TCR/CD3 e CD28, a via PI3K/AKT/mTOR e a via Ras/MEK/Erk (Figura 11), que são essenciais no processo de iniciação da ativação de linfócitos T (PARRY *et al.*, 2005; PATSOUKIS *et al.*, 2012; BARDHAN *et al.*, 2016).

Um dos mecanismos pelo qual o PD-1/PD-L1 atua, inibindo a via PI3K/AKT/mTOR, é através da regulação da caseína quinase 2 (CK2) no processo de regulação da atividade fosfatase e fosforilação de PTEN. O CK2 é responsável por fosforilar o *cluster* Serina/treonina (S380/T382/ T383) da região C-terminal do PTEN (possibilitando a sua estabilização), que conduz para a redução da atividade fosfatase de PTEN contra o substrato fosfatidilinositol trifosfato (PIP3), durante a estimulação desencadeada por TCR/CD3 e CD28. Porém, a ligação de PD-1 à PD-L1 direciona para a inibição de CK2, corroborando para a perda da fosforilação estabilizante no *cluster* Serina/ Treonina da região C-terminal do PTEN, resultando na atividade fosfatase aumentada de PTEN sobre o substrato PIP3 (VAZQUEZ *et al.*, 2000; TORRES e PULIDO, 2000; PATSOUKIS *et al.*, 2013; BARDHAN *et al.*, 2016).

A atuação de PD-1/PD-L1 sobre a via Ras/MEK/Erk compreende a inibição da fosforilase- γ 1 (PLC- γ 1). Em condições normais, após a ativação da quinase ZAP-70, ocorrem várias reações que por fim conduzem para a ativação de PLC- γ 1, que em seguida atua, clivando o fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). A DAG ativa leva a ativação da PKC e RasGRP1, e este último ativa a cascata da MAP quinase. Já o IP3 atua aumentando a concentração intracelular de Ca²⁺, desencadeando a ativação da fosfatase calcineurina (PATSOUKIS *et al.*, 2012). Conforme descrito sobre a via Ras/MEK/Erk, pode-se inferir que a inibição de PLC- γ 1 por PD-1/PD-L1 impossibilita a continuidade da via, visto que inviabiliza a clivagem de PIP2 (EBINU *et al.*, 1998, 2000; BIVONA *et al.*, 2003; ROOSE *et al.*, 2005; BARDHAN *et al.*, 2016).

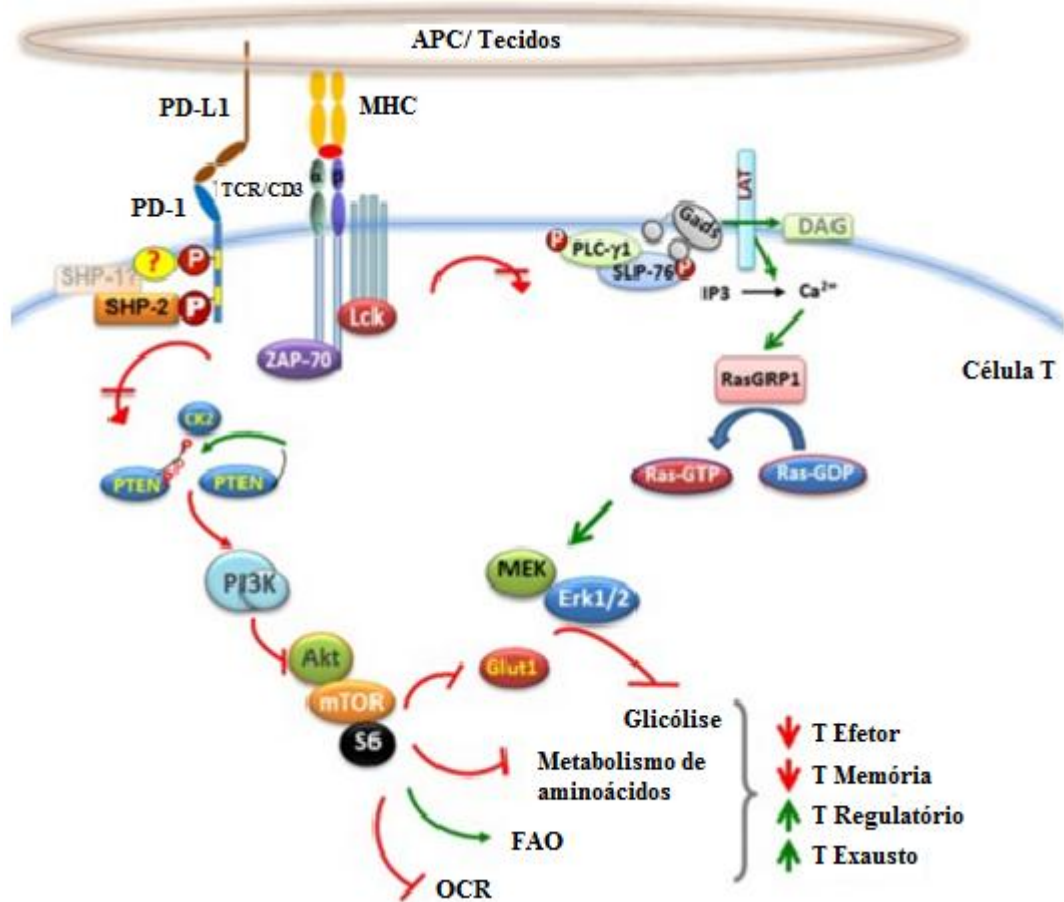


Figura 11 – Mecanismo de inibição desencadeado pela interação PD-1/PD-L1 nas vias PI3K/Akt/ mTOR e Ras/MEK/Erk. APC: Célula Apresentadora de Antígeno; FAO: Oxidação de Ácidos Graxos; OCR: Taxa de Consumo de Oxigênio. Fonte: Adaptado de BARDHAN *et al.*, 2016.

2.5.2.4 Efeitos da Sinalização da Via PD-1/PD-L1

A sinalização de PD-1, quando associado a seus ligantes em linfócitos T ou B ativos, realiza uma regulação imunológica que conduz a transdução de um sinal inibitório. Essa sinalização conduz para a inibição da expressão de receptores e enzimas que estão associadas à glicólise, glutaminólise e ao metabolismo de aminoácidos, além disso, há a diminuição da taxa de acidificação extracelular e da taxa de consumo de oxigênio, e aumento da oxidação de ácidos graxos, em linfócitos T (o que pode dificultar a bioenergética celular), produção de citocinas, proliferação e sobrevivência celular. Além disso, há o impedimento da expressão de fatores de transcrição associados com a função efetora de linfócitos T, como o GATA-3 e Tbet. Outros efeitos da sinalização da via PD-1/PD-L1 incluem a diminuição da fosforilação de CD3, ZAP70 e PCK, assim como a inibição da ativação de Erk, e a inversão do “sinal de

paragem” mediado pela sinalização de TCR (que conduz ao encurtamento no tempo de suas interações com as APCs), que pode levar a uma diminuição da ativação, da formação de memória celular e expansão clonal de linfócitos T, direcionando para a indução de Tregs (LATCHMAN *et al*, 2001; OKAZAKI *et al*, 2001; CHEMNITZ *et al*, 2004; PARRY *et al*, 2005; KEIR *et al*, 2006; FRANCISCO *et al*, 2010; AMARNATH *et al*, 2011; YOKOSUKA *et al*, 2012; RIELLA *et al*, 2012; SZNOL e CHEN, 2013; SHINOZAKI-USHIKU *et al*, 2015).

2.5.2.5 Via PD-1/PD-L1 e o Ciclo Celular

Os linfócitos T primários encontram-se normalmente na fase G0 do ciclo celular, ao qual não há a expressão de ciclinas, que são necessárias para a interagirem com as cinases dependentes de ciclina (CDKs) com a finalidade de formar complexos ciclina-CDK que são fundamentais para direcionar o processo de progressão do ciclo celular. Inicialmente, para ser dada a progressão no ciclo celular é necessário promover a degradação dependente de ubiquitina de p27 (que se encontra abundante nos linfócitos T), que atua inibindo a CDK2, afim de reestabelecer a função da mesma. Para tanto, logo após a estimulação de TCR/CD3 e CD28 ocorre a indução da transcrição de SKP2 (uma ubiquitina que atua degradando o inibidor de CDK2, o p27), porém esse processo necessita da ativação conjunta das vias PI3K/Akt/mTOR e Ras/MEK/Erk ((BOONEN *et al.*, 1999; CARRANO *et al.*, 1999;APPLEMAN *et al.*, 2000, 2002, 2006). Dessa forma, pode-se concluir que PD-1/PD-L1 por inibir estas duas vias de sinalização, evita a indução da transcrição de SKP2, proporcionando o aumento de p27, e conseqüentemente, da inibição de CDK2.

2.5.2.6 Infecções e o Ponto de Controle do Sistema Imune

O cenário da infecção e a inflamação crônica associada ao câncer podem ser importantes quanto à terapêutica baseada no bloqueio dos pontos de controle do sistema imune, visto que estes parecem exercer função proeminente em processos inflamatórios e como defensores tumorais, permitindo a evasão da ação degradativa das células imunes. Um exemplo é o PD-1, expresso em linfócitos T ativos em tecidos periféricos, que quando em contato com seus ligantes, PD-L1 e PD-L2, evita danos colaterais aos tecidos mediante uma

resposta inflamatória. Porém, as células tumorais podem expressar os ligantes de PD-1, conseguindo desta forma a evasão da vigilância imunológica, e isto ocorre principalmente no contexto inflamatório de um câncer associado a uma infecção. Terapêuticas em cânceres não associados a infecções, utilizando anticorpos monoclonais contra PD-1/PD-L1 obtiveram sucesso, o que sugere a adoção dessas terapias em cânceres associados a infecções e inflamação, condições que predisõem à expressão de tais moléculas (CARRENO e COLLINS, 2002; KEIR *et al*, 2008; PENTCHEVA-HOANG *et al*, 2009; FLIES *et al*, 2011; WHERRY, 2011; OTT e HODI, 2013).

A resposta imune utilizada pelos agentes infecciosos, que desencadeiam o processo de carcinogênese, é principalmente a inflamação. Para tal, quimiocinas liberadas no microambiente tumoral atraem vários tipos de células do sistema imune, favorecendo a ocorrência de interações entre as células do estroma e as células do tumor através de receptores de superfície. Em acréscimo, além das células do sistema imune, as células estromais e tumorais produzem uma variedade de citocinas, fatores solúveis angiogênicos e outros, proporcionando a carcinogênese por meio da liberação tanto por via autócrina, quanto parácrina dos mesmos. Além disso, estão envolvidas também neste processo as proteases extracelulares que facilitam a migração de diferentes células via endotélio para o local da inflamação (COUSSENS e WERB, 2002; ROLLINS, 2006; OTT e HODI, 2013).

Estes mecanismos sugerem que a resposta do sistema imune inato e processo inflamatório desencadeados por patógenos, interage com a resposta imune adaptativa, visto que as células do sistema imune inato são importantes nas fases efetoras de linfócitos T, e tais interações podem proporcionar a eliminação do agente desencadeante das respostas imunes e/ou direcionar para processos de iniciação e progressão do câncer. Em síntese, a interação entre a resposta imune inata e adaptativa no microambiente tumoral, pode tanto conduzir para o desenvolvimento e progressão do cancer, assim como a rejeição imunomediada do tumor (KARIN e GRETEN, 2005; OTT e HODI, 2013).

Durante a resposta inflamatória a agentes infecciosos, há a regulação positiva em tecidos periféricos da expressão de ligantes do PD-1, o PD-L1 e PD-L2, em resposta à expressão de interferons do tipo I (α e β) e tipo II (IFN- γ), desencadeando dessa forma infiltrados imunes à ativação da via inibitória PD-1. Entretanto, vale ressaltar que a regulação positiva de PD-L1 em tumores com infecção e inflamação crônica, pode não ser apenas em face da resposta a inflamação conduzida pelo agente infeccioso, mas também como um mecanismo de defesa imunitário do tumor (MAZANET e HUGHES, 2002; OTT e HODI, 2013).

Em estudo de Yuan e colaboradores (2016) foi demonstrado que a expressão de PD-L1 foi maior em adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal do que no tipo difuso, dados que corroboram com a hipótese de que os processos inflamatórios crônicos associados com o câncer gástrico do tipo intestinal, como o causado por infecção por *H. pylori* ou vírus Epstein Barr, podem afetar a expressão de PD-L1.

2.5.2.6.1 Via PD e infecção por *H.pylori*

O *H. pylori* coloniza o estômago humano e promove respostas imunes humorais e celulares. Dentre os fatores de virulência de *H.pylori*, existem genes localizados na ilha de patogenicidade Cag-PAI que codificam um sistema de secreção do tipo 4 (T4SS), assim como o gene que codifica a proteína associada à citotoxina A (CagA). A oncoproteína CagA é injetada para o interior das células epiteliais gástricas pelo sistema de secreção do tipo 4 através de um *Pilus* do *H.pylori*, e uma vez dentro de tais células a CagA é ativada por fosforilação da tirosina quinase dependente de Src, que em seguida ativa proteínas importantes, incluindo a tirosina fosfatase SHP-2 que atua desregulamentando as funções celulares, assim como algumas vias de sinalização essenciais para atuar no delineamento da ação imune do hospedeiro, afim de garantir a sua sobrevivência, como por exemplo, a indução da regulação positiva de PD-L1 em células epiteliais gástricas. Desta forma, mesmo que o hospedeiro apresente uma resposta imune contra o *H.pylori*, esta será ineficaz, visto que os linfócitos T tendem a se mostrar hiporreativos, o que contribui para a cronicidade (BERSTAD *et al*, 1999; ODENBREIT *et al*, 2000; LUCAS *et al*, 2001; HIGASHI *et al*, 2001; POPPE *et al*, 2006; BACKERT e SELBACH, 2008; LINA *et al.*, 2015).

No estudo de Lina e colaboradores (2015), estes utilizaram diferentes tipos de linhagens de células epiteliais gástricas, e então inocularam no grupo controle de *H.pylori* do tipo selvagem com a ilha de patogenicidade Cag-PAI e em outras amostras foram inoculadas *H.pylori* mutantes sem a ilha de patogenicidade Cag-PAI, e os resultados mostraram que apenas houve o aumento da regulação da expressão de PD-L1 em amostras inoculadas com o tipo selvagem da bactéria, além disso, notou-se que a regulação positiva de PD-L1 é diretamente relacionada à presença de T4SS, que é responsável por translocar o CagA para as células epiteliais gástricas e esta proteína, ao ser ativada, modula a regulação positiva de PD-L1 no ambiente gástrico, utilizando a via MAPK p38.

Outro fator de virulência da *H. Pylori*, denominado toxina vacuolítica A (VacA), também tem sido associado a hiporreatividade de linfócitos T, inibição da interleucina 2 (IL-2), assim como na inibição de eventos do ciclo celular e regulação negativa da expressão de receptores de superfície de IL-2, que são fundamentais para a proliferação e viabilidade de linfócitos T, respectivamente (COVER e BLANKE, 2005).

Em estudo de Wu e colaboradores (2010), em 23 pacientes submetidos a endoscopia com retirada de amostras do antro gástrico, 12 destes apresentaram positividade para *H.pylori* e 11 foram negativos. Em todas as amostras foi realizada inicialmente a análise da expressão da proteína PD-L1, e aquelas que apresentavam positividade para a *H. pylori* mostraram maior expressão da PD-L1 do que as amostras *H. Pylori* negativas. Além disso, foi realizada a análise em linhagens de células de adenocarcinoma gástrico humano e em células epiteliais gástricas primárias, e após o período de 24h e 48h posteriores de infecção, notou-se que para ambos os tipos celulares houve a indução da expressão de RNAm de PD-L1, quando comparado aos controles não-infectados, o que os levou a concluir que a *H. pylori* induziu o aumento dos níveis de PD-L1. Também foi investigado se os linfócitos T induzidos como resposta a infecção ao *H.pylori* poderiam influenciar nos níveis de expressão de PD-L1, em células epiteliais gástricas primárias e em linhagens de células de adenocarcinoma gástrico co-cultivadas com linfócitos T ativos, e observou-se que em ambas ocorreu a indução do aumento da regulação da expressão de PD-L1. Em seguida, foi realizada a análise de citocinas Th1, o IFN- γ e TNF- α , quanto à possibilidade destas estarem modulando a expressão de PD-L1 em células epiteliais gástricas primárias e em linhagens de células de adenocarcinoma gástrico, e notou-se que a expressão de RNAm de PD-L1 foi diretamente proporcional às concentrações de IFN- γ e TNF- α em ambos os tipos celulares. Como foi demonstrada que a expressão de PD-L1 por células tumorais é capaz de induzir a apoptose nos linfócitos T, foi avaliado se a apoptose dos linfócitos T pode ser regulado por PD-L1 expressa em células epiteliais gástricas. Ao final foi demonstrado que a expressão de PD-L1 na superfície de células epiteliais gástricas medeia a apoptose de linfócitos T.

Em suma, o estudo realizado por Wu e colaboradores (2010) demonstrou que a infecção por *H. pylori* induz ao aumento da expressão de PD-L1 em um período de 24-48 horas após a infecção. A expressão de PD-L1 pode ser devido a presença de linfócitos T, principalmente linfócitos Th1, que secretam as citocinas IFN- γ e TNF- α , as quais foram diretamente relacionadas com a modulação da expressão desta proteína do ponto de controle do sistema imune.

Em outro estudo, desenvolvido por Beswick e colaboradores (2007), foram utilizadas células epiteliais gástricas incubadas com Linfócitos T *naive*, as quais foram posteriormente infectadas por *H.pylori*. Após a infecção foi observado um aumento da expressão de PD-L1, acompanhada pelo aumento da frequência do fenótipo T regulador nos linfócitos T *naive*. Devido a essa observação, em seguida, foi investigada a correlação entre a frequência do fenótipo T regulador e a expressão de PD-L1, através do bloqueio desta proteína por anticorpos monoclonais ou pequeno RNA de interferência. Esse bloqueio de PD-L1 foi acompanhado pela redução da frequência do fenótipo T regulador, o que levou a concluir que a expressão de PD-L1 regulada positivamente em infecção por *H. Pylori* atua regulando negativamente a ação efetora de linfócitos T, através da indução de um fenótipo T regulador.

Os dados de estudo realizado por Beswick e colaboradores (2007) e Wu e colaboradores (2010), corroboram com estudos prévios de Barrera e colaboradores (2001), Suarez e colaboradores e Das e colaboradores (2006), nos quais foi demonstrado que a *H. pylori* pode utilizar inibir a proliferação de linfócitos T, induzir linfócitos Treg e o aumento da expressão de PD-L1. Estes estudos prévios indicam que talvez esses efeitos na resposta imune, durante a infecção a *H. Pylori* possa ser devido a utilização das células epiteliais gástricas pela bactéria, as quais podem funcionar como APCs locais, já que expressam o MHC de classe II. Além disso, expressam citocinas e receptores que influenciam as respostas de linfócitos T.

2.5.2.6.2 Via PD e Infecção Por Vírus Epstein-Barr

O vírus Epstein-Barr (EBV) associado ao carcinoma gástrico (EBVaGC) apresenta características clinicopatológicas bem definidas, como a predominância no gênero masculino, localização normalmente no estômago proximal, predominância do subtipo difuso de Laurén, tumor com tamanho e profundidade de invasão maiores e um bom prognóstico. O EBVaGC possui também características moleculares que incluem: mutações PIK3CA, hipermetilação do DNA e amplificação de JAK2, PD-L1 e PD-L2. Valendo ressaltar que a amplificação tanto de PD-L1, quanto de PD-L2, é um importante mecanismo para a evasão do sistema imune, garantindo a sobrevivência do vírus e a progressão do tumor. Adicionalmente, tem sido demonstrado que as LMPs (Proteínas Latentes de Membrana) codificadas pelo

EBV podem promover a expressão de PD-L1 em células tumorais (GREEN *et al.*, 2012; ABE *et al.*, 2015; SHINOZAKI-USHIKU *et al.*, 2015; DONG *et al.*, 2016;).

Em face ao conhecimento destes dados, DONG e colaboradores (2016) realizaram um estudo onde foram coletadas amostras de 855 pacientes que haviam se submetido à gastrectomia no período de 2006 a 2012. Em seguida, construíram 23 blocos de TMA, incluindo todas as amostras, depois, estas foram submetidas a ensaio de hibridização *in situ* para detecção de EBER-1 do vírus, as quais 59 dos casos exibiram positividade e foram definidas como EBVaGC, ao passo que as 755 amostras restantes foram negativas sendo definidas como EBVnGC. Posteriormente, foram examinados os níveis de expressão proteicos e valores prognósticos de PIK3CA, JAK2, PD-L1 e PD-L2, através da imunistoquímica (IHQ). Na análise dos resultados, foi observado que o PD-L1 e PD-L2 estavam localizados na membrana e no citoplasma das células tumorais. Em pacientes EBVaGC não foi encontrado nenhum valor prognóstico da PIK3CA, JAK2, PD-L1 e PD-L2. Sendo apenas observada uma elevada expressão de JAK2, PD-L1 e PD-L2 tanto em EBVaGC, quanto em EBVnGC, o que sugere que os três marcadores podem servir como potenciais alvos de terapia individual.

No estudo de Paydas e colaboradores (2015) foram utilizadas 87 amostras de casos linfoma de Hodgkin recém-diagnosticados, as quais foram fixadas em formol e parafinizadas. Posteriormente, foi realizada a hibridização *in situ* para detectar amostras que exibiam positividade para EBER-1 do EBV, que representaram 40 casos (45%), em seguida foi realizado ensaio IHQ de todas as amostras, utilizando anticorpos anti PD-1 e anti-PD-L1 onde foi encontrada a expressão de PD-1 e PD-L1 em 18 casos para cada (20% para cada). Neste estudo não foi encontrada nenhuma correlação entre EBV e PD-1/PD-L1. Porém, em relação ao PD-1 e ao PD-L1 quanto à sobrevida geral média e a sobrevida livre de progressão foi observado que são mais curtas em casos com expressão de PD-1 e PD-L1 do que naqueles sem a expressão (OS: 100 vs. 135 meses para PD-1 e 79 vs. 135 meses para PD-L1; e DFS: 107 vs. 100 meses para PD-1 e 79 vs. 100 meses para PD-L1, respectivamente).

Contrariamente aos dados encontrados por Paydas e Colaboradores (2015) e Dong e Colaboradores (2016), ao qual não foi encontrada correlação entre EBV e a expressão PD-1/PD-L1, análises moleculares realizadas em 295 pacientes com adenocarcinoma gástrico primário não tratados por quimioterapia e radioterapia, disponibilizadas pela TCGA (2014), subdividiu o câncer gástrico em subgrupos moleculares, dentre eles o que apresenta EBV positivo, neste grupo pode ser observada a presença de mutações PI3KCA, hipermetilação do DNA e amplificação de JAK2, PD-L1 e PD-L2 (BASS *et al.*, 2014).

2.6 Tratamento, Fatores Prognósticos e Preditivos e Sobrevida

A expressão elevada de PD-L1, no microambiente tumoral, tem sido correlacionada a características clínico-patológicas agressivas, tumor em estágio avançado, tamanho do tumor, profundidade de invasão, metástase linfonodal, prognóstico desfavorável e recorrência após cirurgia (OHIGASHI *et al* 2005; WU *et al*, 2006; NAKANISHI *et al*, 2007; GAO *et al*, 2009; BASTMAN *et al.*, 2016; QING *et al*, 2015).

Porém, ainda não foi validado um ponto de corte para definir as taxas exatas para se considerar a positividade para expressão de PD-L1. Adicionalmente, as diferenças na especificidade e sensibilidade dos anticorpos comerciais utilizados para a coloração IHQ de PD-1 e/ou PD-L1 pode explicar as diferenças entre os estudos e, indiretamente, no valor prognóstico da via PD-1/PD-L1 (SZNOL e CHEN, 2013; KEDMI *et al*, 2014; PAYDAS *et al.*, 2015).

Dessa forma, muitos estudos estão dando enfoque na harmonização de PD-L1, como o estudo de Scheel *et al.*, (2016) ao qual foi realizada a análise da expressão de PD-L1 por IHQ de 11 amostras de adenocarcinoma pulmonar e 4 de carcinoma de células escamosas, utilizando 4 anticorpos já empregados em ensaios clínicos distintos (28-8, 22C3, SP142 e SP263) conforme seus respectivos protocolos de ensaios clínicos, as quais a partir dos dados de corte destes ensaios foi montado um sistema de pontuação integrado de 6 etapas (Negativo, etapa 1= $\leq 1\%$; Positivo, etapas 1,2,3,4 e 5: $\geq 1\%$, $\geq 5\%$, $\geq 10\%$, $\geq 25\%$ e $\geq 50\%$ respectivamente), em seguida as amostras foram analisadas por 9 patologistas diferentes. A proporção de pontuação de células de carcinoma PD-L1 positivos apresentaram coeficientes de interconcordância moderado para o sistema de pontuação de 6 etapas ($k = 0,47 - 0,50$), enquanto que a concordância dicotômica integrada das coortes apresentou um bom coeficiente de concordância ($k = 0,6 - 0,8$). A proporção de pontuação de células imunes PD-L1 positivas teve índice de concordância baixo ($k = <0,2$) e concordância dicotômica integrada das coortes foi de $k = 0,12 - 0,25$. Os ensaios 28-8, 22C3, SP263 e SP142 marcaram células de carcinoma, porém o SP142 marcou em menor proporção que os demais. Enquanto que em células do sistema imune foram marcadas mais intensamente por SP142 e Sp263, sendo apontada então uma necessidade para se definir um padrão específico para células imunes.

Vários estudos na literatura têm mostrado um prognóstico melhor quando se associa a presença de TIL e PD-L1 no microambiente tumoral. Corroborando com esta hipótese, um estudo de Taube *et al*, (2012) com pacientes com melanoma metastático com positividade para PD-L1 associada com TIL, tinham significativamente maior sobrevida do que aqueles com melanoma metastático com PD-L1 negativos e sem TIL. O estudo de Karim *et al* (2009) em células de carcinoma cervical também encontrou correlação entre a presença de linfócitos infiltrantes tumorais e a positividade para PD-L1 com uma melhor sobrevida.

Nos estudos tanto de Hou e colaboradores (2014) quanto de Geng e colaboradores (2015) em tecidos de câncer gástrico foi observada uma correlação entre a presença de infiltrados de linfócitos T regulatórios FoxP3+ e expressão de PD-L1 com metástase linfonodal, doença em estágio avançado, sobrevida global inferior e prognóstico desfavorável. Já Qing *et al* (2015) observou que o PD-L1 apresentou maiores níveis de expressão em carcinomas gástricos mais diferenciados e com maior estágio T.

Em análise da expressão de PD-L1 em amostras de pacientes de câncer de mama, visando correlacionar tal com as características clínico-patológicas e sobrevida livre de doença e sobrevida global, Baptista e colaboradores (2016), observaram que a expressão de PD-L1 correlacionou com a idade inferior a 50 anos ($P < 0,01$), a presença de tumores maiores ($P < 0,01$), presença de linfonodos positivos ($P < 0,01$), ausência do receptor de estrógeno ($P < 0,01$) e recorrência em locais distantes ($P < 0,01$). Além disso, a expressão de PD-L1 foi associada com uma melhor sobrevida geral (taxa de hazard de 030; intervalo de confiança de 95%, 0,09 – 0,94; $P = 0,04$), o que sugere que a expressão de PD-L1 pode ser útil como um biomarcador prognóstico para a sobrevida global no câncer de mama.

Em estudo de Heeren e colaboradores (2016) foi analisada a expressão de PD-L1 em câncer cervical primário e metastático de dois subtipos histológicos (carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma) na tentativa de traçar associações com as características clínico-patológicas destes pacientes. Os resultados do estudo indicaram uma maior frequência da expressão de PD-L1 em amostras de pacientes com carcinoma de células escamosas do que em amostras de adenocarcinoma. Além disso, a expressão ao longo de todo o tumor de PD-L1 em pacientes com carcinoma de células escamosas foi associada com uma pior sobrevida livre de doença e sobrevida específica da doença, enquanto que a expressão marginal de PD-L1 foi correlacionada com um prognóstico favorável. Por fim, a presença de macrófagos associados a tumores PD-L1 positivos foi correlacionada com uma pior sobrevida específica da doença em relação aos tumores PD-L1 positivos e sem macrófagos associados.

No estudo de Rosenbaum e colaboradores (2016) foram utilizados 181 casos de carcinoma colorretal com instabilidade de microssatélites e estado de mutações previamente analisados, sendo tais associados a expressão de PD-L1, assim como as características clínico-patológicas. Os resultados do estudo mostraram que PD-L1 foi expresso em apenas 16 casos (9%), obtendo correlação com maior frequência em indivíduos com idade avançada ($P = 0,006$), pertencentes ao gênero feminino ($p = 0,035$) e com tumores de tamanho maior ($p = 0,013$). Além disso, foi também possível correlacionar a expressão de PD-L1 com o aumento de linfócitos infiltrantes tumorais T CD8 e Tbet positivos, fenótipo medular, pouca diferenciação, instabilidade de microssatélites, mutação BRAF ($P < 0,001$ cada) e a mutação KRAS ($P = 0,012$). Na análise multivariada a expressão positiva de PD-L1 foi correlacionada com a morfologia medular, frequência de linfócitos infiltrantes de tumor T CD8 positivos e uma menor sobrevida específica da doença. Estes dados em conjunto reforçaram a importância da utilização da IHQ de PD-L1 para avaliar o prognóstico e o caráter preditivo de pacientes com carcinoma colorretal quanto ao uso de terapias de bloqueio da via PD-1/PD-L1.

Paydas e colaboradores (2015), em análises em 87 amostras de casos de linfoma de Hodgkin, encontraram uma associação entre a coexpressão de PD-1 e PD-L1 com pouco tempo de sobrevida. Além disso, tem sido proposto que o PD-L1 contribui para a resistência às drogas, e que o bloqueio de PD-L1 ou PD-1 pode inverter a resistência medicamentosa, contribuindo para a melhora na eficácia terapêutica.

Apesar de muitos estudos relatarem a presença de correlação entre a expressão de PD-L1 com o pouco tempo de sobrevida, no estudo de Cho e colaboradores (2017), os resultados das análises de amostras de pacientes com câncer gástrico MSI-H, diferentemente de tais estudos, mostraram que a expressão de PD-L1 em células imunes localizadas na região intratumoral e peritumoral foi relacionada com uma maior sobrevida destes pacientes.

Vieira e colaboradores (2016) avaliaram os fatores associados com a expressão de PD-L1 em 75 pacientes acometidos com carcinoma sarcomatóide pulmonar, o qual é caracterizado por mau prognóstico independente do estágio, além disso são tumores que apresentam elevado grau de mutações, assim como, elevadas taxas de quimioresistência a terapias baseadas em platina. Neste estudo foi observado que a invasão nos vasos sanguíneos e mutações KRAS foram significativamente associadas com a expressão de PD-L1. Adicionalmente, tumores positivos para PD-L1 mostraram maior infiltração de linfócitos TCD8, CD163 e macrófagos. Estes dados são de acordo com estudo retrospectivo onde no ensaio de fase I com pembrolizumab, KEYNOTE-001, o tratamento com o anticorpo monoclonal anti-PD-L1 induziu a taxas de resposta mais elevadas do tumor nos casos em que

havia mutação no KRAS. E em relação à invasão nos vasos sanguíneos esta foi correlacionada a hipóxia, que por conseguinte induz o fator indutor de hipóxia 1 (HIF-1) que age induzindo a expressão de PD-L1.

Desta forma, de acordo com as evidências a análise da expressão de PD-L1 sozinha ou em associação a expressão de PD-L1 com TIL e a presença de macrófagos associados, pode ser utilizada para prever pacientes que seriam beneficiados com a terapia de bloqueio de PD-1/PD-L1 (SZNOL e CHEN, 2013; MAHONEY *et al.*, 2015).

2.6.1 Imunoterapia

A descoberta de como funciona o sistema imune frente a infecções crônicas e câncer tem contribuído para o desenvolvimento de novos planos de tratamento, como a imunoterapia. O desenvolvimento da imunoterapia voltada para a oncologia se embasou no conceito de que vigilância imunológica pode ser essencial no início da carcinogênese, já que os linfócitos conseguem atuar, eliminando as células tumorais originadas. Assim a imunoterapia tem sido vista como uma boa opção terapêutica para uma ampla variedade de tumores, baseando-se no conceito de que a reativação do sistema imune silenciado contra as células tumorais, pode ter como resultado um melhor controle do tumor, atuando não só diretamente sobre o crescimento de células tumorais, invasão e metástase, mas no processo de reconhecimento das células tumorais como estranhas, estimulando desta forma o sistema imune inato ou adaptativo a eliminar tais células. Porém, o maior desafio para as abordagens imunoterápicas são os múltiplos mecanismos ativos que atuam em conjunto para neutralizar uma resposta antitumoral eficaz, no microambiente tumoral. Um dos âmbitos de pesquisa em imunoterapia tem sido a busca pelo alvejamento de elementos supressivos do sistema imune para então proporcionar o aumento da apoptose de células tumorais (KEDMI *et al.*, 2014; MAHONEY *et al.*, 2015; MURPHY e KELLY, 2015; ROTHSCILD *et al.*, 2015).

Vale salientar, que esses elementos supressivos no microambiente tumoral podem ter o caráter molecular (como IL-10, SCF, IDO, PD-1) ou celular (linfócitos T reguladoras e células supressoras derivadas da mielóide), os quais parecem distinguir conforme a localização tumoral. A interação conjunta destas células e moléculas direciona para um estado de esgotamento funcional de células efetoras importantes no combate ao tumor, tais como os linfócitos T. Atualmente, tem sido desenvolvidas estratégias de tratamento que objetivam

atuar no bloqueio de moléculas co-inibitórias, denominadas como pontos de controle do sistema imunológico, o que poderá restaurar a função efetora e proliferativa de células imunes, ajudando desta forma na superação da resistência imunológica (GAJEWSKI *et al*, 2013; ROTHSCCHILD *et al*, 2015).

2.6.2 Estudos do Bloqueio da Via PD-1/PD-L1 em Câncer Gástrico

Dados experimentais obtidos através de sistemas de cultura de células *in vitro* assim como em modelos animais, além de ensaios clínicos, apontam que a interação entre PD-1 e seu ligante, o PD-L1, representa um importante mecanismo de supressão da ação do sistema imunológico no interior do microambiente tumoral. Dados que podem ser confirmados devido aos estudos clínicos utilizando anticorpos monoclonais com ação direcionada anti-PD-1 ou anti-PD-L1 (Figura 12 A e B, respectivamente) apresentarem a obtenção de êxito e atividade antitumoral apreciável em grupos de pacientes com melanoma, câncer de pulmão e carcinoma de células renais, com resposta clínica duradoura e raras recorrências, talvez devido a formação de uma memória imunológica. Em câncer metastático foi observado o prolongamento da sobrevida de pacientes, após o bloqueio desta via sozinho ou combinado com outras terapias, porém ainda se faz necessária uma combinação terapêutica direcionada (SZNOL e CHEN, 2013; YAO *et al.*, 2013; JOSEPH *et al.*, 2014).

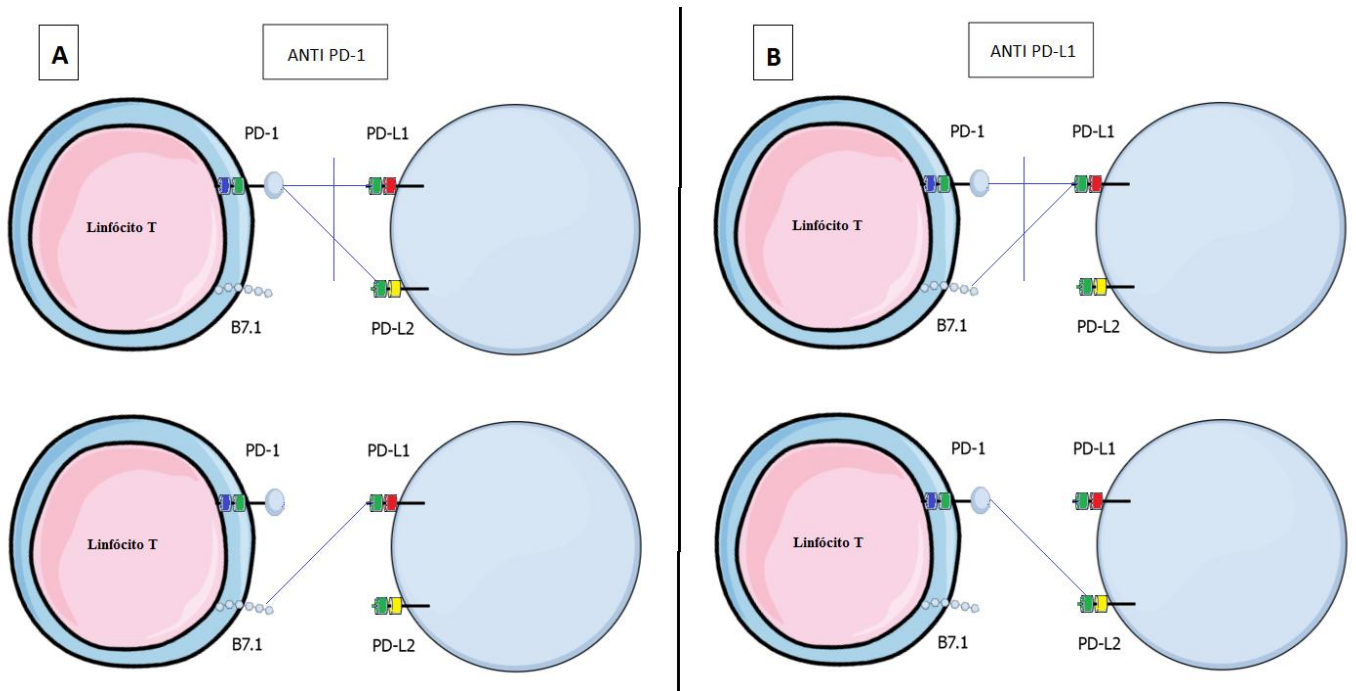


Figura 12 – Mecanismo de bloqueio da terapia utilizando anticorpo monoclonal, **A)** Anti-PD-1 que bloqueia interação entre PD-1 com PD-L1 e PD-L2, mas não impede a interação de PD-L1 com B7.1; e **B)** Anti-PD-L1 que age bloqueando a interação entre PD-L1 com PD-1 e B7.1, mas não impede a interação entre PD-1 e PD-L2. Fonte: Adaptado de GUILLEBON *et al.*, 2015.

Estudos pré-clínicos utilizando modelos de ratos, demonstraram que a administração de anticorpos que bloqueiam a interação de PD-1 com PD-L1 conduz para a infiltração de linfócitos T CD8⁺ específicos no microambiente tumoral, proporcionando a ação anti-tumoral, quer como monoterapia ou em combinação com outras modalidades terapêutica. No entanto, apesar das observações serem encorajadoras, estas terapêuticas tem como limitações as possíveis toxicidades que podem desencadear (OKAZAKI *et al*, 2001; JOSEPH *et al.*,2014).

No estudo de Joseph e colaboradores (2014) foram relatados os três primeiros casos de dermatite liquenóide como reações adversas em pacientes com melanoma metastático tratados com terapia anti-PD-1 (MK-3475), dois participantes do ensaio clínico NCT02083484 e 1 participante do ensaio clínico NCT01295827. As reações adversas encontradas foram suaves, permitindo que os pacientes continuassem a terapia, e em todos os 3 casos, o uso tópico de corticosteróides atenuou as reações.

As reações adversas de grau 3-4 são prevalentes entre 9-14% dos pacientes, sendo citada a toxicidade pulmonar. Outras reações adversas citadas foram: colite, hipotireoidismo e artropatias poliarticulares (BERGER *et al*, 2008; BRAHMER *et al*, 2010; 2012)

O Pembrolizumab (MK-3475) é um anticorpo monoclonal humanizado IgG4/kappa, potente e altamente seletivo que bloqueia a interação entre PD-1 com seus ligantes, PD-L1 e PD-L2, tem obtido resultados encorajadores em vários tumores sólidos avançados e em tumores hematológicos. Este anticorpo monoclonal, já possui aprovação em diversos países para ser utilizado na terapia de pacientes com melanoma metastático, e nos EUA é aprovado para uso terapêutico em pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células metastático e que teve progressão através ou após a quimioterapia composta por platina e com expressão de PD-L1, a partir da IHQ do mesmo (MURO *et al.*, 2016; PUZZONI *et al.*, 2016).

Um estudo fase Ib (KEYNOTE-012; Clinicaltrials.gov: NCT01848834) em 39 pacientes testou a atividade, segurança e tolerabilidade do pembrolizumab em pacientes com adenocarcinoma gástrico ou câncer da junção gastroesofágica recorrente/metastático. Um dos principais critérios de elegibilidade foi a IHQ positiva para PD-L1 em mais do que 1% das células tumorais foi um dos principais critérios de elegibilidade utilizado. Neste estudo, os pacientes receberam a dose de 10 mg/kg de pembrolizumab a cada 2 semanas por 24 meses ou até atingirem a resposta completa, a confirmação da progressão da doença, morte, toxicidade inaceitável, com a retirada de consentimento, ou a decisão investigador. O desfecho primário de eficácia foi a taxa de resposta global (TRG). A TRG observada foi de 32% na população asiática e 30% entre os pacientes restantes. Finalmente, observou-se uma associação significativa entre a expressão PD-L1 e ambos, sobrevivência livre de progressão (PFS) e a taxa de resposta global. Neste estudo, os resultados sugerem que o pembrolizumab pode ser administrado com segurança em pacientes com adenocarcinoma gástrico avançado ou câncer de junção esofagogástrica, obtendo atividade anti-tumoral clinicamente significativa em pacientes que haviam sido submetidos a tratamento prévio (MURO *et al.*, 2016).

Em ensaio clínico de fase II que foi lançado em março de 2015 (KEYNOTE- 059; Clinicaltrials.gov: NCT02335411) para testar Pembrolizumab em pacientes com adenocarcinoma gástrico ou de junção esofagogástrica recorrente ou metastático com idade \geq 18, tanto em monoterapia, quanto em combinação com a cisplatina e o 5-fluorouracil (ou capecitabina em pacientes japoneses). Este estudo foi dividido em três coortes, e dados referentes à coorte 1 e 2 já foram publicados (FUCHS *et al.*, 2015).

Na coorte 1 foram cadastrados 259 participantes que evoluíram após \geq 2 regimes quimioterápicos anteriores e obtiveram ECOG PS de 0-1, este grupo recebeu Pembrolizumab 200 mg por via intravenosa no primeiro dia de cada ciclo de três semanas por 2 anos, ou até a progressão da doença ou retirada do participante pelo investigador ou toxicidade inaceitável.

Os participantes PD-L1 positivos tiveram expressão $\geq 1\%$ em células tumorais e estromais, utilizando a IHQ. Os pontos finais primários foram a taxa de resposta objetiva, segurança e tolerabilidade. Quanto aos resultados da coorte 1 dos 259 pacientes registrados, 48,3% receberam pembrolizumab como terapia de terceira linha (3L) e quarta linha (4L), 57% apresentaram expressão positiva de PD-L1 em tumores, as taxas de resposta objetiva (ORR), de resposta completa, de resposta parcial, de estabilização da doença e de progressão da doença, foram de 11,2%; 1,9%; 9,3%; 17% e 55,6%, respectivamente. A duração de resposta média foi de 8,1 meses (intervalo, 1.4+ to 15.1+). A taxa de resposta objetiva em participantes que receberam o pembrolizumab como terapia de terceira e quarta linhas foi de 14,9% e 7,2%, respectivamente. Em participantes PD-L1 positivos as taxas de resposta objetiva, de resposta completa e de resposta parcial foram de 15,5%; 2% e 13,5%, respectivamente. Já em participantes PD-L1 negativos as taxas de resposta objetiva, de resposta completa e de resposta parcial foram de 5,5%; 1,8% e 3,7%, respectivamente. Nos participantes terapia 3L e PD-L1 positivos, as taxas de resposta objetiva e de resposta completa foram de 21,3%; 4,3%, respectivamente. Enquanto que em participantes terapia 3L e PD-L1 negativos, as taxas de resposta objetiva e de resposta completa foram de 6,9%; 3,4%, respectivamente. As reações adversas associadas ao tratamento foram de grau 3-5 e ocorreram em 43 participantes, levando a descontinuação do tratamento em dois participantes, e sendo fatal para outros dois participantes (FUCHS *et al.*, 2017).

Na coorte 2 foram cadastrados 25 participantes, pacientes com idade ≥ 18 e com adenocarcinoma gástrico ou de junção esofagogástrica recorrente ou metastático, doença mensurável, sem terapia prévia para doença metastática / avançada e ECOG PS 0-1. este grupo recebeu Pembrolizumab 200 mg por via intravenosa no primeiro dia de cada ciclo de três semanas + Cisplatina 80 mg/m² por seis ciclos + 5-FU 800 mg/m² (ou capecitabina 1000 mg/m² no Japão) no primeiro dia de cada ciclo de 3 semanas, com duração de 2 anos ou até a progressão da doença, ou a retirada do participante pelo investigador ou por toxicidade inaceitável. Os participantes PD-L1 positivos tiveram expressão $\geq 1\%$ em células tumorais e estromais, utilizando a IHQ. Os pontos finais primários foram a segurança e tolerabilidade, assim como a taxa de resposta objetiva, a taxa de duração da resposta, a taxa de sobrevida livre progressão e sobrevida geral. Quanto aos resultados, 64% dos participantes apresentaram expressão positiva de PD-L1 em tumores, além disso 84% haviam interrompido o tratamento, principalmente devido à progressão da doença clínica ou radiológica. As taxas de resposta objetiva, de estabilização da doença e de progressão da doença foram de 60%, 32% e 4%, respectivamente, os casos em que não foi possível avaliar, representaram 4%. A taxa de

resposta objetiva foi de 68,8% em participantes PD-L1 positivos e de 37,5% em participantes PD-L1 negativos. A duração de resposta média foi de 6,6 meses (intervalo, 2,6 – 14,4+), 4,6 meses em participantes PD-L1 positivos e de 5,4 meses em participantes PD-L1 negativos. A sobrevida livre de progressão média foi de 6,6 meses e a sobrevida geral foi de 13,8 meses. As reações adversas associadas ao tratamento foram de grau 3-5 e ocorreram em 76% dos participantes, levando a descontinuação do tratamento em três participantes (Bang *et al.*, 2017).

Um ensaio clínico de fase III também foi lançado em Março de 2015 (KEYNOTE-061; Clinicaltrials.gov: NCT02370498), ao qual os pacientes com adenocarcinoma gástrico ou de junção esofagogástrica avançados serão divididos aleatoriamente para receber pembrolizumab ou paclitaxel como um tratamento de segunda linha após a falta de eficácia na terapêutica utilizando regime contendo uma platina e fluoropirimidina. O desfecho primário será a PFS e OS em tumores positivos para PD-L1 (OHTSU *et al.*, 2015).

Posteriormente, em julho de 2015, foi lançado outro ensaio clínico de fase III (KEYNOTE-062; Clinicaltrials.gov: NCT02494583), ao qual será composto por participantes com adenocarcinoma gástrico ou de junção esofagogástrica avançados que serão divididos aleatoriamente em três braços: pembrolizumab como monoterapia, ou pembrolizumab + cisplatina + 5-fluorouracil (5-FU) ou capecitabina, ou placebo + cisplatina + 5-FU ou capecitabina (TABERNERO *et al.*, 2016).

Outro anticorpo monoclonal anti PD-1, o nivolumabe (Clinicaltrials.gov: NCT02267343), está sendo testado em um ensaio de fase, em pacientes com câncer gástrico avançado irrissecável ou recorrente (incluindo tumores resultantes da junção esofagogástrica) que são refratários ou intolerantes ao regime de tratamento padrão, afim de avaliar a segurança e eficácia de Nivolumab em relação a um placebo.

Avelumab é outro anticorpo monoclonal IgG1 anti-PD-L1 totalmente humano que também tem sido estudado em câncer gástrico. Em ensaios de Fase I com o avelumab como único agente (Clinicaltrials.gov: NCT01943461), indivíduos japoneses que apresentavam quadro de câncer gástrico e que haviam obtido falha na eficácia ao final de um ou dois regimes terapêuticos foram selecionados para participarem do estudo. Dados do ensaio mostram que os 20 pacientes que foram tratados com uma dose de 10 mg/kg de avelumab por via intravenosa a cada 2 semanas, 65% destes apresentou uma taxa de controle da doença, com 15% ORR (IC 95%, 3,2-37,9). Além disso, apenas um paciente teve uma reação adversa associada ao avelumab (BOYERINAS *et al.*, 2015; YAMADA *et al.*, 2015).

Apesar dos resultados encorajadores, existem pacientes que apresentam resistência a ação do bloqueio da via PD-1, o que pode levar a inferir que outras moléculas que também estão relacionadas a exaustão de linfócitos T, como o CTLA-4, TIM-3 e LAG-3 podem estar expressas, sugerindo que futuramente pode ser interessante a exploração de uma abordagem terapêutica sinérgica com estas outras moléculas co-inibitórias (CURRAN *et al.*, 2010; NGIOW *et al.*, 2011; WOO *et al.*, 2011; MELERO *et al.*, 2013; GROS *et al.*, 2014).

3 APLICABILIDADE CLÍNICA

Grande parte do câncer humano apresenta um microambiente com resposta imune de padrão “inflamatório” e devido esse cenário, a edição e regulação do sistema imune tem sido bastante estudada em tumores sólidos. Vários *trials* executados em centros de pesquisa têm investigado a expressão de PD-1 e PD-L1 em linfócitos intratumorais e peritumorais e sua correlação com o prognóstico. Pesquisas experimentais e clínicas sugerem que os inibidores do ponto de controle imune, incluindo agentes anti-PD-1 e anti-PD-L1, podem aumentar a vulnerabilidade das células tumorais à destruição imune e potencialmente melhorar a sobrevivência de pacientes em várias neoplasias malignas. Já tem sido observado que as células de adenocarcinoma gástrico possuem a capacidade de expressar PD-L1, como um mecanismo para diminuir a resposta local a linfócitos T e dados apontam que a expressão de PD-L1 varia conforme o tipo tumoral. Dessa forma, avaliar a expressão de PD-1 e PD-L1 em populações de linfócitos e células neoplásicas, associando-se às características dos pacientes e do adenocarcinoma gástrico podem contribuir para estudos que avaliem a segurança, farmacocinética, imunogenicidade e eficácia de drogas anti- PD-L1 baseadas em anticorpos. Em conjunto, as análises da expressão de PD-L1 e PD-1, com as correlações com as características clinicopatológicas, poderão caracterizar o subgrupo de pacientes candidatos à terapia com anticorpos monoclonais anti-PD-1 e anti-PD-L1.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Avaliar a expressão de PD-1 e PD-L1 em adenocarcinoma gástrico primário e tecido não neoplásico adjacente ao tumor.

4.2 Objetivos Específicos

- Descrever a expressão imunofenotípica de PD-L1 em células neoplásicas do adenocarcinoma gástrico dos tipos intestinal e difuso de Laurén.
- Descrever e comparar a expressão imunofenotípica de PD-1 em linfócitos intratumorais (TIL) e em linfócitos do tecido adjacente ao tumor.
- Identificar a localização (membrana e/ou citoplasma) e tipo celular com expressão dos marcadores pesquisados.
- Associar a expressão imunoistoquímica de PD-L1 e PD-1 com gênero e idade do paciente com adenocarcinoma gástrico.
- Associar a expressão imunoistoquímica de PD-L1 e PD-1 com a localização do tumor, grau de diferenciação histológica e estadiamento patológico.

5 METODOLOGIA

5.1 Caráter do Estudo, Local e Amostragem

Trata-se de um estudo transversal retrospectivo e prospectivo, que foi realizado na cidade de Belém, Pará, Região Norte do Brasil, Amazônia Oriental, e abrangeu o período de 2008 a 2016, em pacientes provenientes desse ou de outros municípios do Estado. Foram recrutados 150 participantes com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico atendidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) da Universidade Federal do Pará (UFPA). As amostras parafinadas do tecido gástrico tumoral e tecido adjacente ao tumor tiveram procedência da Unidade de Anatomia Patológica da Instituição.

5.2 Aspectos Éticos

Esta pesquisa foi embasada em preceitos éticos regidos pela Declaração de Helsinque e Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. E todos os participantes envolvidos foram devidamente informados quanto aos objetivos da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes de qualquer abordagem ou acesso aos dados demográficos e clinicopatológicos.

5.3 Critérios de Inclusão

- A) Maiores de 18 anos;
- B) Atendidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico.
- C) TCLE assinado.

5.4 Critérios de Exclusão

- A) Pacientes com adenocarcinoma gástrico submetidos a tratamento neoadjuvante;
- B) Indisponibilidade dos blocos de parafina.

5.5 Histopatologia, Construção do Microarranjo do Tecido (TMA)

O bloco de TMA foi construído, utilizando-se casos de adenocarcinoma gástrico e tecido adjacente ao tumor. Os casos foram provenientes do arquivo da Anatomia Patológica do HUJBB-UFPA, e as lâminas originais foram revistas, e quando houve necessidade, foram realizados novos cortes histológicos, as quais foram devidamente corados pela técnica de HE. Após revisão das lâminas, foram selecionados apenas os blocos que apresentaram áreas representativas do tumor e do tecido adjacente tumoral.

As áreas mais representativas foram identificadas e selecionadas através da leitura microscópica dos cortes histológicos dispostos em lâminas, posteriormente, tais áreas foram marcadas com caneta permanente tanto nas lâminas quanto nos blocos de parafina correspondentes (blocos doadores). Em seguida, foi realizada a construção do microarranjo do tecido com o auxílio do aparelho *TMA Grand Master* da 3DHISTECH Ltd, que foi programado para retirar cilindros de 1,5 mm, que por conseguinte foram transferidos para o bloco de parafina receptor.

Para cada caso foram retirados dois cilindros de 1,5 mm (*cores*) de duas áreas distintas do adenocarcinoma e do tecido adjacente ao tumor, aos quais foram transferidos para blocos de parafina respectivos das amostras para estudo. Após a construção do microarranjo de tecido, foi montado um sistema de coordenadas em tabelas em Excel, com a finalidade de facilitar a determinação da posição exata dos casos nos blocos receptores, tendo como referência um fragmento de fígado (Fragmento sinal). Os casos foram dispostos em ordem numérica crescente (de acordo com o registro anatomopatológico do Serviço de Anatomia Patológica).

Cada bloco de TMA foi submetido à microtomia seriada, que permitiu a obtenção de cortes histológicos com espessura de 4 µm, que posteriormente foram dispostos em lâminas

histológicas com carga para imunoistoquímica. Esquema metodológico detalhado na Figura 13.

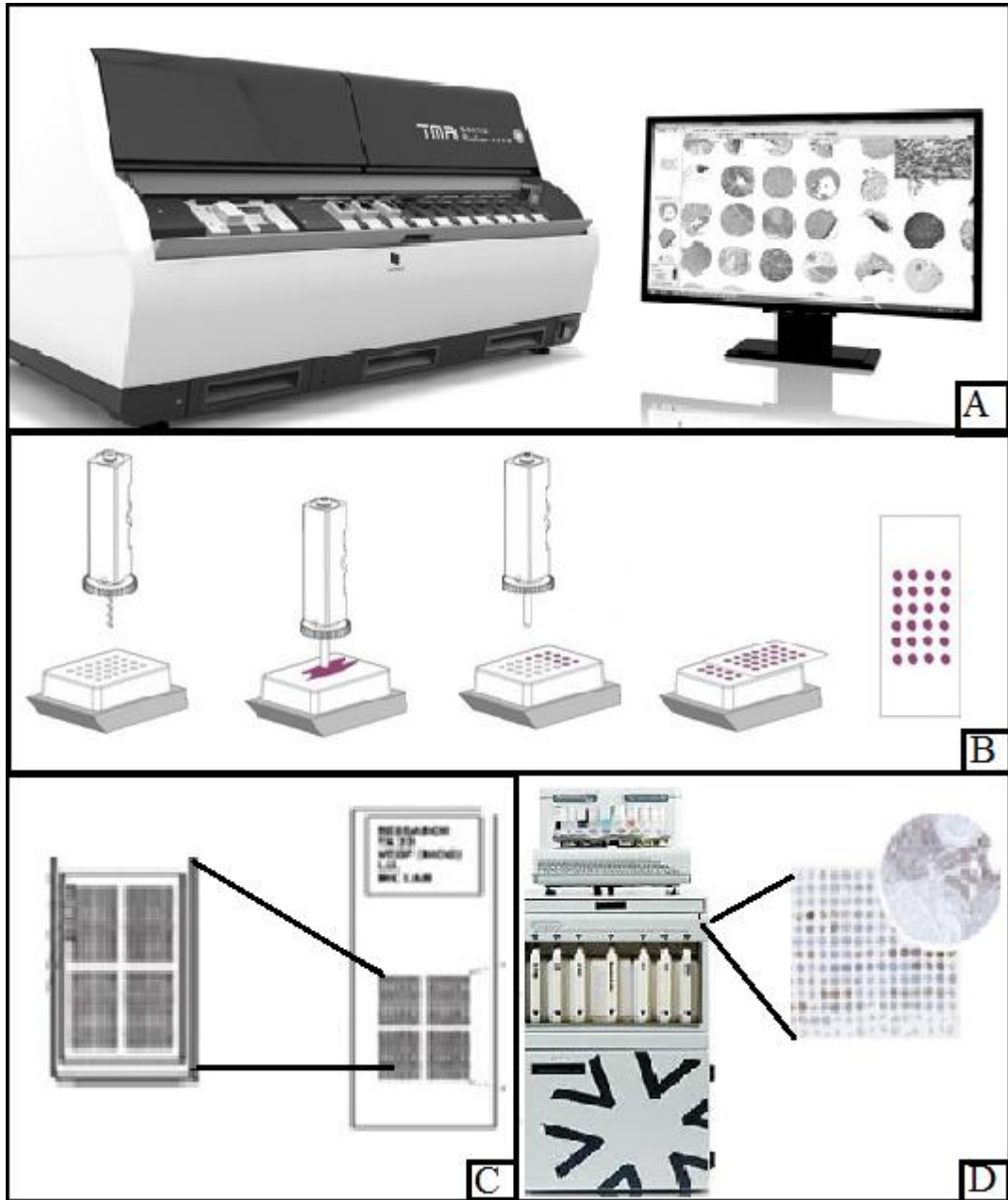


Figura 13 - Esquema representativo da construção do bloco de TMA, através da retirada de cilindros de 1,5 mm de diâmetro dos blocos doadores e transferência dos mesmos para bloco receptor e marcação imunoistoquímica (A – Equipamento para construção de microarranjo, TMA GRAND MASTER; B- Transferência de área selecionada do bloco doador para o bloco receptor, formação do bloco com microarranjo de TMA, ao qual é submetido à microtomia seriada, disposto em lâmina e corado pela técnica de HE; C- Um dos cortes histológicos obtidos é disposto em lâmina com carga, ao qual é identificada com etiqueta de acordo com protocolo de marcação imunoistoquímica cadastrado no aparelho GX automatizado Ventana (Roche®); D- As lâminas com etiqueta de identificação são colocadas no aparelho de imunoistoquímica, e ao fim do procedimento é obtida lâmina com marcação imunoistoquímica).

5.6 Imunoistoquímica de PD-1 e PD-L1

Os cortes histológicos sequenciais do TMA foram obtidos para utilização de anticorpo. A visualização empregou o sistema *Ultraview Dab* kit no equipamento GX automatizado Ventana (Roche®) de Imunoistoquímica. Inicialmente, foi feita uma marcação para padronização da reação em tecido parafinado de linfonodo para PD-L1 e tecido parafinado tumoral para PD-1, onde já são conhecidas as expressões de ambos os marcadores do estudo. Nestes tecidos, foram realizadas diluições seriadas aos quais direcionaram na escolha da concentração de melhor performance.

O sistema de automatização realizou todas as etapas requeridas para uma marcação de imunoistoquímica, diminuindo a variação de resultados. Devido a pré-fixação e impregnação com parafina, as lâminas que continham as seções de 4 µm foram aquecidas por 2 horas à temperatura de 60 graus Celsius, numa estufa pré-aquecida, com a finalidade de aumentar adesão do tecido na lâmina. Essa etapa facilitou o tratamento subsequente, a desparafinização com reagente.

A reação programada foi realizada no carrossel acoplado à máquina, onde as lâminas foram distribuídas em unidades, os *termopads*, responsáveis pelo ciclo de aquecimento, que foi curto. Os *termopads* ficaram submetidos à ação de um vórtex que atuou impedindo a redeposição de parafina sobre a lâmina, o que facilitou dessa forma a remoção da mesma, e contribuiu para que a posterior distribuição dos reagentes sobre a lâmina tenha sido por igual.

Após terem sido tratadas as lâminas foram cobertas com *Liquid Cover Slide* (LCS), um composto de moléculas de óleo orgânico aquoso à tensão superficial e cuja a densidade é acentuadamente menor do que a da água, fato que contribuiu para que o óleo tenha se espalhado sobre a superfície do tampão e formado uma câmara de solução, ao qual serviu como uma barreira aquosa entre os reagentes e o ar. A barreira previniu a evaporação, e tornou o meio aquoso estável para a imunoistoquímica.

As soluções auxiliares (*Reaction Buffer*; *EZprep*; *CC1*; *SSC*) que foram utilizadas em maior volume foram diluídas. Um fluído detergente (*EZprep*) reduziu a tensão superficial da solução aquosa, e auxiliou na liberação da parafina derretida da superfície do tecido. A solução estabilizante e lavagem RB (*Reaction Buffer Concentrate Tris based buffer solution* -

pH 7.6 ± 0.2) foi aplicada intercaladamente durante os passos principais com o objetivo de manter a estabilidade do ambiente da reação e enxaguar as lâminas.

A solução de recuperação, CC1 que é um tampão à base de Tris de pH ligeiramente básico. Atuou em temperaturas elevadas promovendo a hidrólise de ligações covalentes entre grupos amino e aldeídos formados pela fixação com formalina. Esse tratamento resultou em benefícios expressivos na ligação do anticorpo, pois possibilitou um aumento na acessibilidade dos sítios, e melhorou a relação sinal /ruído.

O tampão SSC de cloreto de sódio e citrato de sódio foi usado para lavagens mais vigorosas e conduziu para a abertura de mais sítios. Esta solução teve como função o controle da concentração de sal, através do fornecimento de íons que ocultaram parcialmente a carga negativa do fosfato do DNA e RNA. Assim como o CC1, esse tampão teve a funcionalidade de adequar o pH do meio para os dois tipos de anticorpos utilizados no estudo.

Os anticorpos utilizados, anti-PD-1 (ab52587) de camundongo e anti-PD-L1 (ab12337) de coelho, reagem com espécies variadas. A diluição dos anticorpos foi realizada na concentração de 1:200 para anti-PD-L1 e 1:50 para anti-PD-1. O meio de recuperação requerido para ambos foi por tampão citrato com pH6. O kit de visualização escolhido foi o *Ultraview Universal Dab Detection Kit*, que dispõe em seu conteúdo *ultraView Universal DAB Inhibitor*, *Universal HRP Multimer*, *DAB H2O2* e *Universal Copper*, aos quais foram os componentes principais do sistema de marcação.

A utilização dos reagentes foi de forma automatizada e o protocolo foi pré-definido de acordo com os requisitos do sistema de visualização e dos anticorpos primários.

As etapas que seguem são as mesmas utilizadas globalmente nas técnicas de IHQ indireta manual, e são: [1] desparafinização estufa (2 horas – 60°C); [2] desparafinização (EZprep); [3] aplicação do LCS; [4] recuperação antigênica simultânea (CC1;SSC); [5] bloqueio da peroxidase endógena; [6] Aplicação do anticorpo primário; [7] Coquetel do polímero HRP; [8] Aplicação cromógeno/ Substrato(DAB); [9] bloqueio do DAB; [10] Coloração pela Hematoxilina (10 min).

5.7 Análise da Expressão de PD-1 e PD-L1

Em relação à interpretação da imunoistoquímica, foram utilizados os critérios de marcação adotados por Scheel e colaboradores (2016) e BÖGER e colaboradores (2016) e,

tanto para PD-1 quanto para PD-L1 (Tabela 1), além disso, a análise foi realizada em duplicata e avaliada visualmente por uma patologista por 2 vezes cada duplicata.

As células de adenocarcinoma gástrico foram avaliadas para o anti-PD-L1, e apenas foram consideradas positivas quando a membrana citoplasmática apresentou coloração parcial ou completa, para tais a quantificação foi realizada através de uma proporção entre as células coradas e não coradas (N° de células neoplásicas PD-L1 positivas \div N° total de células neoplásicas).

As células imunológicas foram avaliadas para o anti-PD-1 e apenas foram consideradas positivas quando o citoplasma e/ou membrana citoplasmática apresentou coloração parcial ou completa, para tais a quantificação foi realizada através da análise da área coberta por células imunes coradas ($\text{Área coberta por células imunes positivas} \div \text{Área tumoral}$).

Para a interpretação imunoistoquímica qualitativa (Tabela 2), foi considerada a intensidade de coloração, sendo separada em 4 critérios com Escore definido para cada, onde a ausência de coloração representou o escore 0, coloração em intensidade fraca representou o escore 1, coloração em intensidade moderada representou escore 2 e por fim, amostras que apresentaram intensidade de coloração forte foram consideradas como escore 3.

Tabela 1 – Interpretação imunoistoquímica semi-quantitativa de PD-1 e PD-L1

CRITÉRIOS	ESCORE	PROPORÇÃO
NEGATIVO	0	0 a <1%
POSITIVO	1	$\geq 1\%$ a <10%
POSITIVO	2	$\geq 10\%$ a < 25%
POSITIVO	3	$\geq 25\%$ a <50%
POSITIVO	4	$\geq 50\%$

Fonte: Adaptado SCHEEL *et al.*, 2016 e BÖGER *et al.*, 2016

Tabela 2 – Interpretação imunoistoquímica qualitativa (intensidade da coloração) de PD-1 e PD-L1

CRITÉRIOS	ESCORE
AUSENTE OU NEGATIVO	0
POSITIVO FRACO	1
POSITIVO MODERADO	2
POSITIVO FORTE	3

Fonte: Adaptado SCHEEL *et al.*, 2016 e Böger *et al.*, 2016

5.8 Graduação e Estadiamento Patológico

Foi utilizada a graduação histopatológica em graus I (bem), II (moderado) e III (pouco diferenciado) e o sistema de classificação desenvolvido pela “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) para o câncer de estômago. Os tumores primários na JEG com seu epicentro proximal em dois a cinco centímetros do estômago, ou aqueles que se encontram na cárdia e não invadem a JEG, foram estadiados de acordo com o sistema de estadiamento para câncer gástrico do Cancer Staging Manual da AJCC.

Os tumores que envolvem a JEG e possuem o seu epicentro proximal em até dois centímetros do estômago foram estadiados de forma similar ao adenocarcinoma de esôfago. O estadiamento TN descreve duas características anatômicas relacionadas ao câncer: T) a localização e extensão do tumor primário; N) a presença ou ausência de linfonodos envolvidos. O estadiamento utilizado foi o patológico (pTN) descrito nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Estadiamento patológico do tumor gástrico primário (pT).

pTx	Tumor primário não avaliável
pT0	Sem evidência de tumor primário
pTis	Carcinoma <i>in situ</i> : tumor intraepitelial sem invasão da lâmina própria, displasia de alto grau
pT1	Tumor invade lâmina própria, ou muscular da mucosa ou submucosa.
pT1a	Tumor invade lâmina própria ou muscular da mucosa.
pT1b	Tumor invade submucosa.
pT2	Tumor invade muscular própria.
pT3	Tumor penetra tecido conjuntivo da subserosa sem invadir o peritônio visceral ou estruturas adjacentes.
pT4	Tumor invade a serosa ou estruturas adjacentes.
pT4a	Tumor invade a serosa (peritônio visceral).
pT4b	Tumor invade estruturas/orgãos adjacentes.

Fonte: Cancer Staging Manual. AJCC, 2017

Tabela 4 – Estadiamento patológico de linfonodos regionais (pN)

pNX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
pN0	Sem metástase em linfonodos regionais.
pN1	Metástase em 1-2 linfonodos regionais.
pN2	Metástase em 3-6 linfonodos regionais.
pN3	Metástase em 7 ou mais linfonodos regionais.
pN3a	Metástase em 7-15 linfonodos regionais.
pN3b	Metástase em 16 ou mais linfonodos regionais.

Fonte: Cancer Staging Manual. AJCC, 2017.

5.9 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados afim de verificar associação entre a expressão da proteína e as variáveis categóricas, os dados demográficos dos pacientes e patológicos do adenocarcinoma gástrico, foram comparados, utilizando o teste exato de Fisher, através do

programa estatístico SPSS v17 (SPSS inc., Chicago, IL, USA) e MATLAB®, v R2014b (MathWorks). Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

Todos os dados referentes aos pacientes que participaram do estudo foram agrupados e armazenados em um banco de dados no programa Excel (Microsoft®).

6 RESULTADOS

6.1 Características Epidemiológicas e Histopatológicas

No que concerne às características epidemiológicas dos pacientes e histopatológicas dos adenocarcinomas gástricos, ambas foram incluídas em uma tabela de contingência (Tabela 5), ao qual os dados são relacionados aos marcadores utilizados no estudo, PD-L1 e PD-1.

De acordo com os dados apresentados, é possível observar a prevalência de pacientes do gênero masculino (66,3%), com idade superior a 50 anos (78,3%), com topografia tumoral sendo de superposições (*overlapping*) (51,1%), apresentando o tipo histológico intestinal de Láuren (67,4%), grau II (moderado) de diferenciação (43,5%), com doença em estadió avançado (92,4%) e com metástase linfonodal (81,5%).

Tabela 5 - Características epidemiológicas dos pacientes e histopatológicas dos adenocarcinomas gástricos e imunofenótipo PD-1/PD-L1.

Categorias (Parâmetros)	PD-1/PD-L1 N=92	
	n	(%)
Gênero		
<i>Masculino</i>	61	(66,3)
<i>Feminino</i>	31	(33,7)
Idade		
< 50 anos	20	(21,7)
≥50 anos	72	(78,3)
Topografia		
<i>Cárdia, JEG</i>	2	(2,2)
<i>Corpo</i>	18	(19,6)
<i>Antro</i>	23	(25)
<i>Piloro</i>	2	(2,2)
<i>Superposições (overlapping):</i>	47	(51,1)
<i>Antro e piloro</i>	17	(18,5)
<i>Antro e corpo</i>	15	(16,3)
<i>Corpo e fundo</i>	1	(1,1)
<i>Antro, piloro e corpo</i>	6	(6,6)
<i>Cárdia, corpo e antro</i>	4	(4,4)
<i>Cárdia, fundo e corpo</i>	1	(1,1)
<i>4 associações</i>	3	(3,3)
Classificação de Láuren		
<i>Intestinal</i>	62	(67,4)
<i>Difuso</i>	29	(31,5)
<i>Misto</i>	1	(1,1)
Grau de Diferenciação		
<i>Grau I (Bem)</i>	3	(3,3)
<i>Grau II (Moderado)</i>	40	(43,5)
<i>Grau III (Pouco diferenciado)</i>	19	(20,6)
<i>Não se aplica</i>	30	(32,6)
Estadiamento patológico pT		
<i>pT1 (Precoce)</i>	7	(7,6)
<i>pT2, pT3 e pT4 (Avançado)</i>	85	(92,4)
Estadiamento patológico pN		
<i>pN0</i>	17	(18,5)
<i>pN1</i>	14	(15,2)
<i>pN2</i>	22	(23,9)
<i>pN3</i>	39	(42,4)

6.2 Resultados das Expressões Imunoistoquímicas

6.2.1 Grupo de Pacientes com Adenocarcinoma Gástrico

A imunorreatividade para PD-1 (Tabela 6) foi avaliada no infiltrado linfocitário do microambiente intratumoral e foi observada no citoplasma, e ocorreu em 64 casos (69,5%). Vale ressaltar que foi avaliado um número reduzido de linfócitos intratumorais (<100) na área selecionada para o microarranjo de adenocarcinoma (TMA).

A imunorreatividade para PD-L1, parcial ou completa na membrana citoplasmática, foi observada em 8 (8,7%) dos 92 casos analisados (Tabela 6). Não foi observada imunorreatividade para PD-L1 em células imunes, nessa série.

Tabela 6- Distribuição dos casos PD-L1 em células neoplásicas e PD-1 em linfócitos no “microambiente intratumoral”

Tipos Celulares	Total N= 92 (%)		PD-1		PD-L1	
	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)
Células Neoplásicas						
NEGATIVO (<1%)	84	(91,3)	0	0	84	(91,3)
POSITIVO	8	(8,7)			8	(8,7)
Fraco (1+): $\geq 1\%$ a $< 10\%$	5	(5,4)	0	0	5	(5,4)
Moderado (2+): $\geq 10\%$ a $< 25\%$	2	(2,2)	0	0	2	(2,2)
Forte (3+): $\geq 50\%$	1	(1,1)	0	0	1	(1,1)
Linfócitos intratumorais						
NEGATIVO (<1%)	28	(30,4)	28	(30,4)	0	0
POSITIVO FRACO (1+): $\geq 1\%$ a $< 10\%$	64	(69,6)	64	(69,6)	0	0

Na tabela 7 estão contidos os dados referentes aos aspectos epidemiológico, histopatológico e estadiamento dos casos de adenocarcinoma gástrico. Dentre os casos ao qual

foi observada a imunorreatividade para PD-1, a maioria pertencia ao gênero masculino (47,8%) e apresentavam idade ≥ 50 anos (55,4%); quanto as topografias, na maioria o tumor estava localizado no antro (18,5%), corpo (15,2%) e superposições (*Overlapping*); no que se refere à classificação de Laurén, (48,9%) foram intestinais, (19,6%) difuso e (1,1%) misto; O grau II de diferenciação (moderado) foi o mais observado, e ocorreu em (28,3%); quanto ao estadiamento (4,4%) foram considerados precoces (T1) e (65,2%) em estadio avançado (T2, T3 e T4), com ou sem acometimento linfonodal, (10,9%) sem metástase e (58,7%) com metástase (N1, N2 e N3).

Enquanto que dentre os casos em que ocorreu a imunorreatividade para PD-L1, a maioria pertencia ao gênero feminino (5,4%) e apresentava idade ≥ 50 anos (6,6%); as topografias mais prevalentes foram o corpo (4,4%) e superposições (*overlapping*) (4,4%); todos os 8 casos (8,7%) foram do tipo histológico intestinal de Láuren e em estadiamento avançado (T2, T3 e T4), com grau II de diferenciação (moderado) em (5,4%) e pouco diferenciado em (3,3%); (2,2 %) sem metástase em linfonodo (N0) e (6,6%) com metástase linfonodal (N2 e N3).

Tabela 7 - Distribuição dos casos de adenocarcinoma gástrico, aspectos epidemiológicos, histopatológicos e estadiamento patológico com imunofenótipo PD-1/PD-L1.

Categorias (Parâmetros)	Total N= 92 (%)		PD-1 (linfócito intratumoral)				PD-L1 (célula neoplásica)			
			Negativo n= 28		Positivo n= 64		Negativo n= 84		Positivo n= 8	
	N	(%)	n	(%)	n	(%)	N	(%)	n	(%)
Gênero										
<i>Masculino</i>	61	(66,3)	17	(18,5)	44	(47,8)	58	(63)	3	(3,3)
<i>Feminino</i>	31	(33,7)	11	(12)	20	(21,7)	26	(28,3)	5	(5,4)
Idade										
<i>< 50 anos</i>	20	(21,7)	7	(7,6)	13	(14,1)	18	(19,6)	2	(2,2)
<i>≥50 anos</i>	72	(78,3)	21	(22,8)	51	(55,4)	66	(71,7)	6	(6,6)
Topografia										
<i>Cárdia, JEG</i>	2	(2,2)	1	(1,1)	1	(1,1)	2	(2,2)	0	0
<i>Corpo</i>	18	(19,6)	4	(4,4)	14	(15,2)	14	(15,2)	4	(4,4)
<i>Antro</i>	23	(25)	6	(6,6)	17	(18,5)	23	(25)	0	0
<i>Piloro</i>	2	(2,2)	1	(1,1)	1	(1,1)	2	(2,2)	0	0
<i>Superposições (overlapping):</i>	47	(51,1)	16	(17,4)	31	(33,7)	43	(46,7)	4	(4,4)
<i>Antro e piloro</i>	17	(18,5)	4	(4,4)	13	(14,1)	15	(16,3)	2	(2,2)
<i>Antro e corpo</i>	15	(16,3)	6	(6,6)	9	(9,7)	14	(15,2)	1	(1,1)
<i>Corpo e fundo</i>	1	(1,1)	0	0	1	(1,1)	1	(1,1)	0	0
<i>Antro, piloro e corpo</i>	6	(6,6)	3	(3,3)	3	(3,3)	6	(6,6)	0	0
<i>Cárdia, corpo e antro</i>	4	(4,4)	1	(1,1)	3	(3,3)	4	(4,4)	0	0
<i>Cárdia, fundo e corpo</i>	1	(1,1)	0	0	1	(1,1)	0	0	1	(1,1)
<i>4 associações</i>	3	(3,3)	2	(2,2)	1	(1,1)	3	(3,3)	0	0
Classificação de Láuren										
<i>Intestinal</i>	62	(67,4)	17	(18,5)	45	(48,9)	54	(58,7)	8	(8,7)
<i>Difuso</i>	29	(31,5)	11	(12)	18	(19,6)	29	(31,5)	0	0
<i>Misto</i>	1	(1,1)	0	0	1	(1,1)	1	(1,1)	0	0
Grau de Diferenciação										
<i>Grau I (Bem)</i>	3	(3,3)	0	0	3	(3,3)	3	(3,3)	0	0
<i>Grau II (Moderado)</i>	40	(43,5)	14	(15,2)	26	(28,3)	35	(38)	5	(5,4)
<i>Grau III (Pouco diferenciado)</i>	19	(20,6)	3	(3,3)	16	(17,4)	16	(17,4)	3	(3,3)
<i>Não se aplica</i>	30	(32,6)	12	(13)	18	(19,6)	30	(32,6)	0	0
Estadiamento patológico pT										
<i>pT1 (Precoce)</i>	7	(7,6)	3	(3,3)	4	(4,4)	7	(7,6)	0	0
<i>pT2, pT3 e pT4 (Avançado)</i>	85	(92,4)	25	(27,2)	60	(65,2)	77	(83,7)	8	(8,7)
Estadiamento patológico pN										
<i>pN0</i>	17	(18,5)	7	(7,6)	10	(10,9)	15	(16,3)	2	(2,2)
<i>pN1</i>	14	(15,2)	3	(3,3)	11	(12)	14	(15,2)	0	0
<i>pN2</i>	22	(23,9)	7	(7,6)	15	(16,3)	20	(21,7)	2	(2,2)
<i>pN3</i>	39	(42,4)	11	(12)	28	(30,4)	35	(38)	4	(4,4)

A Figura 14 ilustra a imunomarcção de PDL-1 em células neoplásicas do adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal de Laurén.

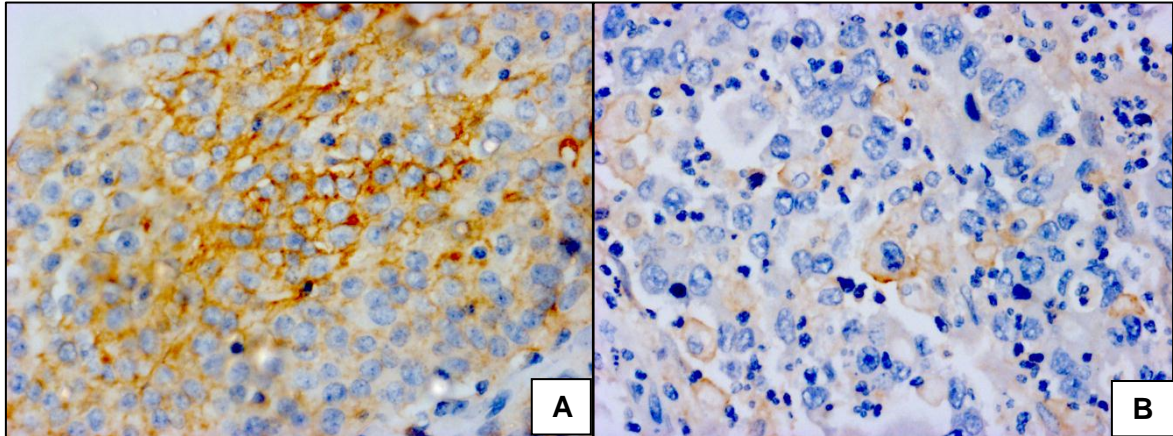


Figura 14 - Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal de Laurén com imunorreatividade nas células neoplásicas para PDL1 (A) Caso 1312-14 D (Positivo Forte; $\geq 50\%$; Escore 3) e (B) 3053-15 D (Positivo Fraco; $\geq 1\%$ - $\leq 10\%$; Escore 1).

A figura 15 ilustra a ausência de imunorreatividade de PDL-1 em células neoplásicas do adenocarcinoma gástrico dos tipos intestinal (A) e difuso (B) de Laurén.

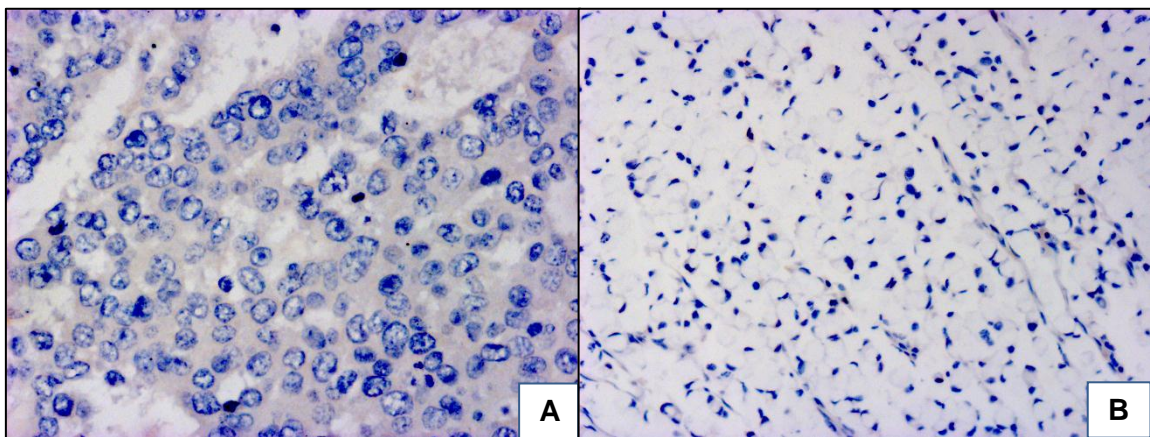


Figura 15 - Ausência de imunorreatividade para PDL1 nas células neoplásicas do Adenocarcinoma gástrico (A) de tipo intestinal caso 1553-10 e (B) de tipo difuso caso 2066-09.

A coexpressão dos marcadores analisados (Tabela 8) foi observada em 6 casos (6,6%), e nestes a maioria pertencia ao gênero feminino (4,4%) e apresentavam idade ≥ 50 anos (4,4%); quanto a topografia, a mais prevalente foi o corpo (3,3%) e superposições (*Overlapping*) em (3,3%); em relação a classificação de Láuren, todos os (6,6%) foram do tipo intestinal; no que concerne ao grau de diferenciação (3,3%) apresentavam grau II (moderado)

e (3,3%) grau III (pouco diferenciado); Quanto ao estadiamento todos apresentavam estadiamento avançado (T3 e T4), com ou sem acometimento linfonodal, 1 caso (1,1%) sem metástase e 5 casos (5,4%) com metástase linfonodal (N2 e N3).

Tabela 8 - Distribuição dos casos de adenocarcinoma gástrico, aspectos epidemiológicos, histopatológicos e estadiamento patológico com coexpressão de PD-1/PD-L1.

Categorias (Parâmetros)	Total N= 92 (%)		PD-1e PD-L1 n= 6 (6,6)	
	n	(%)	N	(%)
Gênero				
<i>Masculino</i>	61	(66,3)	2	(2,2)
<i>Feminino</i>	31	(33,7)	4	(4,4)
Idade				
<i>< 50 anos</i>	20	(21,7)	2	(2,2)
<i>≥50 anos</i>	72	(78,3)	4	(4,4)
Topografia				
<i>Cárdia, JEG</i>	2	(2,2)	0	0
<i>Corpo</i>	18	(19,6)	3	(3,3)
<i>Antro</i>	23	(25)	0	0
<i>Piloro</i>	2	(2,2)	0	0
<i>Superposições (overlapping):</i>	47	(51,1)	3	(3,3)
<i>Antro e piloro</i>	17	(18,5)	1	(1,1)
<i>Antro e corpo</i>	15	(16,3)	1	(1,1)
<i>Corpo e fundo</i>	1	(1,1)	0	0
<i>Antro, piloro e corpo</i>	6	(6,6)	0	0
<i>Cárdia, corpo e antro</i>	4	(4,4)	0	0
<i>Cárdia, fundo e corpo</i>	1	(1,1)	1	(1,1)
<i>4 associações</i>	3	(3,3)	0	0
Classificação de Láuren				
<i>Intestinal</i>	62	(67,4)	6	(6,6)
<i>Difuso</i>	29	(31,5)	0	0
<i>Misto</i>	1	(1,1)	0	0
Grau de Diferenciação				
<i>Grau I (Bem)</i>	3	(3,3)	0	0
<i>Grau II (Moderado)</i>	40	(43,5)	3	(3,3)
<i>Grau III (Pouco diferenciado)</i>	19	(20,6)	3	(3,3)
<i>Não se aplica</i>	30	(32,6)	0	0
Estadiamento patológico pT				
<i>pT1 (Precoce)</i>	7	(7,6)	0	0
<i>pT2, pT3 e pT4 (Avançado)</i>	85	(92,4)	6	(6,6)
Estadiamento patológico pN				
<i>pN0</i>	17	(18,5)	1	(1,1)
<i>pN1</i>	14	(15,2)	0	0
<i>pN2</i>	22	(23,9)	1	(1,1)
<i>pN3</i>	39	(42,4)	4	(4,4)

6.2.2 PD-1 em Linfócitos intratumorais (TILs) e adjacente ao adenocarcinoma

Na tabela 9 estão contidos os casos em que ocorreu a imunorreatividade para PD-1 em linfócitos do tecido adjacente ao adenocarcinoma gástrico e os dados referentes aos aspectos epidemiológico, histopatológico e estadiamento. A maioria pertencia ao gênero feminino (20,9%) e apresentava idade ≥ 50 anos (20,9%). As topografias mais frequentes foram o corpo (20,6%) e superposições (*overlapping*) em 4,6%; adenocarcinoma do tipo histológico intestinal de Láuren (30,2%); grau II (moderado) de diferenciação (14%) e grau III (pouco diferenciado) em (14%) dos casos; estadio avançado (34,9%), 5 casos (11,6 %) sem metástase em linfonodo (N0) e 11 casos (25,6%) com metástase (N2 e N3).

Tabela 9 – Imunorreatividade para PD-1 e aspectos epidemiológico, histopatológico e estadiamento de amostras de tecido adjacente ao adenocarcinoma gástrico

Parâmetros (Categorias)	PD-1 no tecido adjacente					
	Total N= 43 (%)		Negativo n= 27		Positivo n= 16	
	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)	<i>N</i>	(%)
Gênero						
<i>Masculino</i>	22	(51,2)	15	(34,9)	7	(16,3)
<i>Feminino</i>	21	(48,8)	12	(27,9)	9	(20,9)
Idade						
<i>< 50 anos</i>	13	(30,3)	6	(14)	7	(16,3)
<i>≥50 anos</i>	30	(69,7)	21	(48,8)	9	(20,9)
Topografia						
<i>Corpo</i>	32	(74,4)	21	(48,8)	11	(25,6)
<i>Antro</i>	6	(14)	3	(7)	3	(7)
<i>Superposições (overlapping):</i>						
<i>Antro e corpo</i>	2	(4,6)	1	(2,3)	1	(2,3)
<i>Metaplasia sem definição de local</i>	3	(7)	2	(4,6)	1	(2,3)
Classificação de Láuren						
<i>Intestinal</i>	32	(74,4)	19	(44,2)	13	(30,2)
<i>Difuso</i>	11	(25,6)	8	(18,6)	3	(7)
Grau de Diferenciação						
<i>Grau I (Bem)</i>	4	(9,3)	3	(7)	1	(2,3)
<i>Grau II (Moderado)</i>	19	(44,3)	13	(30,3)	6	(14)
<i>Grau III (Pouco diferenciado)</i>	9	(21)	3	(7)	6	(14)
<i>Não se aplica</i>	11	(25,6)	8	(18,6)	3	(7)
Estadiamento patológico pT						
<i>pT1 (Precoce)</i>	11	(25,6)	10	(23,3)	1	(2,3)
<i>pT2, pT3 e pT4 (Avançado)</i>	32	(74,4)	17	(39,5)	15	(34,9)
Estadiamento patológico pN						
<i>pN0</i>	16	(37,2)	11	(25,6)	5	(11,6)
<i>pN1</i>	5	(11,6)	5	(11,6)	0	0
<i>pN2</i>	7	(16,3)	4	(9,3)	3	(7)
<i>pN3</i>	15	(34,9)	7	(16,3)	8	(18,6)

Na tabela 10 está descrito um comparativo entre a imunorreatividade para PD-1 em linfócitos intratumorais (TIL) no adenocarcinoma gástrico e em linfócitos presentes no tecido

adjacente ao tumor. Pode-se observar que a imunorreatividade para PD-1 foi maior em linfócitos intratumorais (17%) do que em linfócitos presentes no tecido adjacente ao adenocarcinoma (9%). Em ambos, prevalência no tipo histológico intestinal de Laurén, grau II de diferenciação (moderado) e estadiamento avançado.

Tabela 10 - Distribuição comparativa da imunorreatividade para PD-1 entre linfócitos intratumorais e linfócitos do tecido adjacente ao adenocarcinoma gástrico

Categorias (Parâmetros)	Total N=24 (%)		PD-1 em linfócito intratumoral				PD-1 em linfócito do tecido adjacente ao tumor			
			Negativo n= 7		Positivo n= 17		Negativo n= 15		Positivo n= 9	
	n	(%)	n	(%)	N	(%)	n	(%)	n	(%)
Gênero										
<i>Masculino</i>	13	(54,2)	5	(20,8)	8	(33,3)	8	(33,3)	5	(20,8)
<i>Feminino</i>	11	(45,8)	2	(8,3)	9	(29,2)	7	(29,2)	4	(16,7)
Idade										
<i>< 50 anos</i>	9	(37,5)	2	(8,3)	7	(29,2)	3	(12,5)	6	(25)
<i>≥50 anos</i>	15	(62,5)	5	(20,8)	10	(41,7)	12	(50)	3	(12,5)
Classificação de Láuren										
<i>Intestinal</i>	19	(79,2)	5	(20,8)	14	(58,3)	11	(45,8)	8	(33,3)
<i>Difuso</i>	5	(20,8)	2	(8,3)	3	(12,5)	4	(16,7)	1	(4,2)
Grau de Diferenciação										
<i>Grau I (Bem)</i>	1	(4,2)	0	0	1	(4,2)	1	(4,2)	0	0
<i>Grau II (Moderado)</i>	13	(54,2)	3	(12,5)	10	(41,7)	8	(33,3)	5	(20,8)
<i>Grau III (Pouco diferenciado)</i>	5	(20,8)	2	(8,3)	3	(12,5)	2	(8,3)	3	(12,5)
<i>Não se aplica</i>	5	(20,8)	2	(8,3)	3	(12,5)	4	(16,7)	1	(4,2)
Estadiamento patológico pT										
<i>pT1 (Precoce)</i>	5	(20,8)	1	(4,2)	4	(16,7)	5	(20,8)	0	0
<i>pT2, pT3 e pT4 (Avançado)</i>	19	(79,2)	6	(25)	13	(54,2)	10	(41,7)	9	(37,5)
Estadiamento patológico pN										
<i>pN0</i>	10	(41,7)	4	(16,7)	6	(25)	6	(25)	4	(16,7)
<i>pN1</i>	3	(12,5)	0	0	3	(12,5)	3	(12,5)	0	0
<i>pN2</i>	4	(16,7)	1	(4,2)	3	(12,5)	2	(8,3)	2	(8,3)
<i>pN3</i>	7	(29,2)	2	(8,3)	5	(20,8)	4	(16,7)	3	(12,5)

A Figura 16 ilustra a imunorreatividade de PD-1 em linfócitos no microambiente do adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal de Laurén.

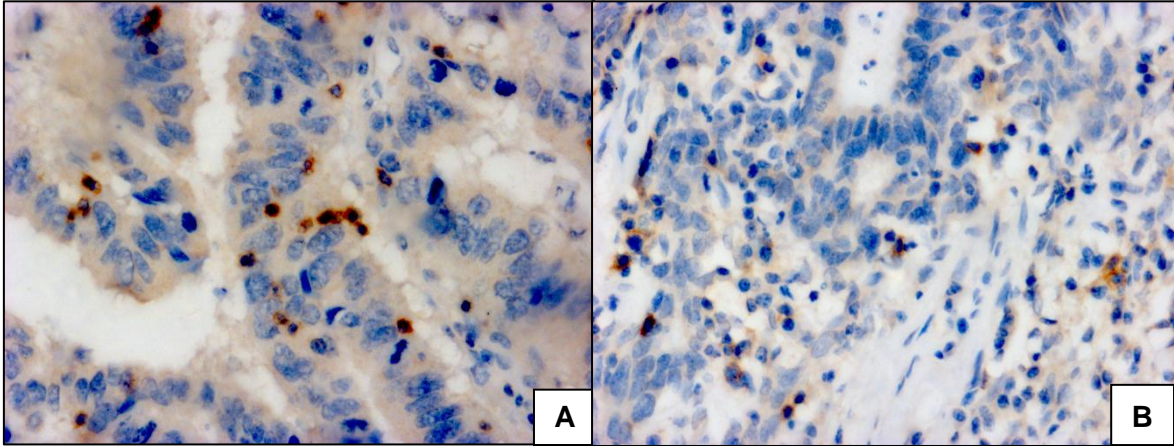


Figura 16 - Imunorreatividade para PD-1 em linfócitos intratumorais do adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal de Laurén, (A) caso 313-14 (Positivo Fraco; $\geq 1\%$ - $\leq 10\%$; Escore 1) (B) caso 2741-08 (Positivo Fraco; $\geq 1\%$ - $\leq 10\%$; Escore 1).

A Figura 17 ilustra a imunorreatividade de PD-1 em linfócitos do tecido adjacente não tumoral (A) e (B).

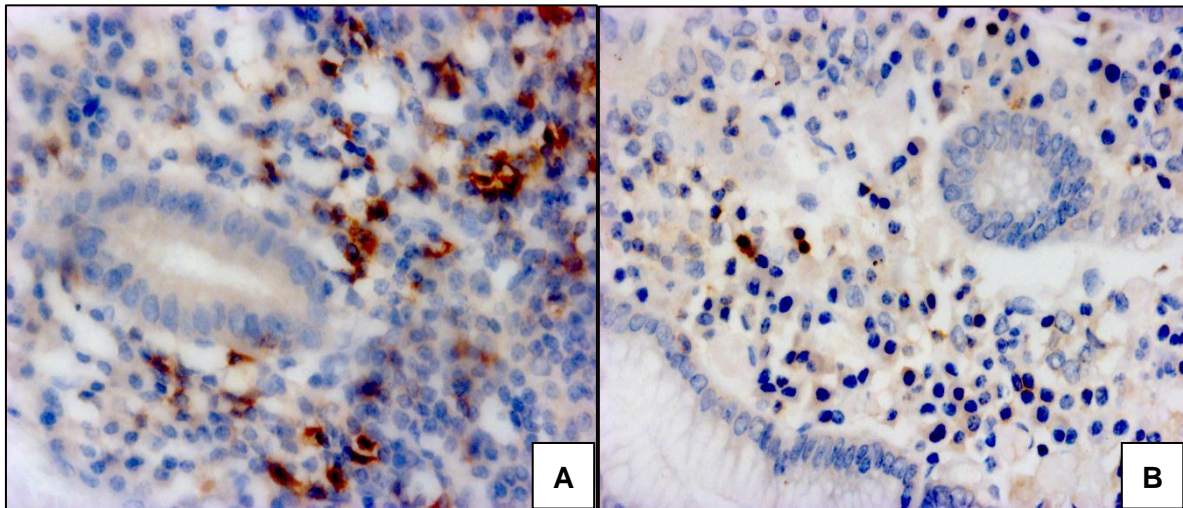


Figura 17 - Imunorreatividade para PD-1 em linfócitos intratumorais do adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal de Laurén, (A) caso 1043-10 (Positivo Forte; $\geq 25\%$ - $< 50\%$; Escore 3) e (B). caso 750-13 (Positivo Fraco; $\geq 1\%$ - $\leq 10\%$; Escore 1).

7 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como embasamento o caráter descritivo da expressão imunofenotípica de PD-1 e PD-L1 em amostras de adenocarcinoma gástrico e de tecido adjacente ao tumor de pacientes atendidos no hospital universitário João de Barros Barreto.

Inicialmente, vale ressaltar os dados relativos às características epidemiológicas dos pacientes acometidos com adenocarcinoma gástrico, incluídos na pesquisa, ao qual foi observada maior frequência em indivíduos do gênero masculino, dado que se assemelha aos divulgados em relação ao câncer gástrico para esta variável, no mundo, no Brasil e na região Norte (GLOBOCAN, 2012; INCA, 2016). Outra característica observada foi a maior frequência em indivíduos com idade superior a 50 anos, dado que também corresponde a informações contidas na literatura (SOUZA *et al.*, 2013; KARIMI *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2015). Em relação ao tipo histológico e estadiamento foi mais frequente os casos de adenocarcinoma de tipo histológico intestinal de Lauren, estadio avançado e grau II de diferenciação. Esses achados demonstram que a amostragem do estudo é de fato representativa do aspecto epidemiológicos, clínicos e histopatológicos do adenocarcinoma gástrico no Pará e, portanto, viável para a análise realizada.

Neste estudo, foi dado enfoque para a imunoterapia, ao qual tem sido enquadrada como uma opção viável para o tratamento de diversos tipos de tumores, uma vez que possui como base a reativação do sistema imunológico silenciado para que o mesmo atue contra as células do tumor, e assim elimine-as. Entretanto, ainda existem desafios a serem vencidos pela imunoterapia, a citar os múltiplos mecanismos que se encontram ativos e atuam conjuntamente no microambiente do tumor, desencadeando a neutralização de uma resposta antitumoral eficiente (KEDMI *et al.*, 2014; MAHONEY *et al.*, 2015; MURPHY e KELLY, 2015; ROTHSCHILD *et al.*, 2015). Dentre estes mecanismos supressivos, há aqueles que possuem o caráter molecular, ao qual englobam os denominados pontos de controle do sistema imune, e para tais já estão sendo desenvolvidas estratégias de tratamento e os resultados tem sido promissores (GAJEWSKI *et al.*, 2013; SABATIER *et al.*, 2014; ROTHSCHILD *et al.*, 2015).

Um dos eixos que atua como ponto de controle do sistema imune é a via PD-1/PD-L1, cuja análise imunofenotípica foi realizada nesse estudo. O PD-1 é um receptor expresso predominantemente em linfócitos T e B, e que possui como principal ligante o PD-L1, cuja

expressão já foi detectada em diversos tipos de câncer. E anticorpos monoclonais anti-PD-1 e anti-PD-L1 já foram desenvolvidos, como o Pembrolizumab, um anticorpo anti-PD-1 que inclusive possui aprovação para ser utilizado no tratamento de pacientes com melanoma e carcinoma de pulmão não pequenas células metastático (SZNOL e CHEN, 2013; GUILLEBON *et al.*, 2015; BARDAN *et al.*, 2016). Muitos estudos em adenocarcinoma gástrico tem relatado a expressão de PD-L1 como mecanismo de evasão imune no microambiente tumoral.

O adenocarcinoma gástrico, de acordo com a classificação de Laurén (1965), é subdividido em dois tipos predominantes: intestinal e difuso, os quais possuem características histológicas e clinicopatológicas distintas (CORREA *et al.*, 1975; CARNEIRO *et al.* 2004), o que sugere rotas moleculares distintas, fato que direcionou para a hipótese de que há diferença entre a expressão de PD-L1 e PD-1 entre estes tipos histológicos.

Nessa série de 92 casos de adenocarcinoma gástrico primário, a imunorreatividade para PD-L1 foi detectada em 8 casos (8,7%), sendo a maioria pertencente ao gênero feminino, com idade ≥ 50 anos, apresentando topografia em sua maioria no corpo e superposições (*Overlapping*), do tipo histológico intestinal de Láuren, estadiamento avançado com metástase linfonodal e grau II de diferenciação.

Os dados relativos ao gênero e idade dessa série de casos foram similares aos encontrados por Rosenbaum e colaboradores (2016) que detectaram expressão de PD-L1 em 16 casos (9%) de uma amostragem de 181 pacientes, correlacionada com maior frequência em indivíduos com idade avançada e pertencentes ao gênero feminino. Em outros dados encontrados na literatura, há contraposição em relação ao gênero, sendo o masculino o mais frequente (ZHANG *et al.*, 2015; BÖGER *et al.*, 2016; CHO *et al.*, 2017).

No que concerne à topografia, em estudos de Qing e colaboradores (2015) e Cho e colaboradores (2017), a topografia mais frequente foi o antro.

Em relação a maior frequência do tipo histológico intestinal de Láuren, estadiamento avançado e presença de metástase linfonodal, na série imunorreativa para PD-L1, os dados foram similares aos já descritos na literatura (HOU *et al.*, 2014; QING *et al.*, 2015; BASTMAN *et al.*, 2016; BÖGER *et al.*, 2016; YUAN *et al.*, 2016; CHO *et al.*, 2017).

Quanto ao grau de diferenciação encontrado em maior frequência neste estudo (Grau II de diferenciação), este achado é contrario ao encontrado por Qing e colaboradores (2015), BÖGER e colaboradores (2016) e Yuan e colaboradores (2016), ao qual foi encontrada expressão de PD-L1 correlacionada ao grau III de diferenciação (pouco diferenciadas), o que pode ser justificado pela etapa de escape do sistema imune, caracterizada pela presença de

células tumorais pouco imunogênicas e capazes de modular mecanismos que garantem a sua sobrevivência, dentre eles moléculas coinibidoras de linfócitos T, como o PD-L1. Porém o achado neste estudo pode representar que a a fase de escape do sistema imune, pode já está ocorrendo a partir do grau de diferenciação II (moderado).

Conforme os critérios de interpretação imunoistoquímica, semi-quantitativo e qualitativo, adotados neste estudo, a imunorreatividade para PD-L1 foi detectada em baixo número de células, correspondendo a cinco casos (5,4%) positivos com escore 1 (proporção <10% de células neoplásicas) e com intensidade de coloração fraca, dois casos (2,2%) com escore 2 (proporção $\geq 10\%$ a <25%) e intensidade moderada e um caso (1,1%) com escore 4 (proporção $\geq 50\%$) e forte intensidade. A frequência de imunorreatividade para PD-L1 encontrada neste estudo foi semelhante à descrita por Rosenbaum e colaboradores (2016) e Cho e colaboradores (2017), que descreveram imunorreatividade de 9%. No entanto, vale salientar que em outros estudos, a frequência de imunorreatividade para PD-L1 variou entre 20 a 54% (PAYDAS *et al.*, 2015; QING *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015; MURO *et al.*, 2016; BÖGER *et al.*, 2016).

A divergência entre 8,7% de expressão fenotípica para PD-L1 nessa série e a literatura com achados que variam de 9% a 54% pode ser em função do critério de interpretação para positividade utilizado neste estudo, ao qual foram considerados apenas os casos com número de células neoplásicas que apresentavam imunorreatividade igual ou superior a 1%, diferente de outros autores (BÖGER *et al.*, 2016; MURO *et al.*, 2016) que consideram qualquer número, mesmo inferior a 1%.

Vale ressaltar também que a maioria dos casos analisados (92,4%) apresentava estadiamento avançado, e de acordo com os resultados encontrados por Böger e colaboradores (2016), a expressão de PD-L1 se modifica durante a progressão do tumor, uma vez que em seu estudo a imunorreatividade foi maior em estadiamento pT2, e decaiu em tumores com estadiamento pT3 e pT4.

Outra possibilidade para a frequência de 8,7% de imunorreatividade encontrada neste estudo para PD-L1 é que nos casos em que não houve a imunorreatividade, outras moléculas relacionadas à inibição imune podem estar sendo expressas, como o CTLA-4, TIM-3 e LAG-3.

Uma vez que no microambiente tumoral do adenocarcinoma gástrico, há outros tipos celulares, como as células do sistema imune (WU *et al.*, 2012; QUAIL e JOYCE, 2013; BUSUTTIL *et al.*, 2014), foi realizada a avaliação da expressão de PD-1 em linfócitos. No infiltrado de linfócitos do microambiente intratumoral, foi observada a expressão de PD-1 em

64 casos (69,5%), sendo esse resultado mais frequente em pacientes do gênero masculino, com idade ≥ 50 anos e em tumores com topografia no antro e no corpo, classificação do tipo intestinal de Laurén, estadiamento avançado com metástase linfonodal, e grau II de diferenciação. Todos esses dados são semelhantes aos encontrados por Böger e colaboradores (2016), exceto quanto ao grau de diferenciação, ao qual foi mais frequente o grau III de diferenciação.

Nessa série de casos, foi detectada expressão imunofenotípica de PD-1 em linfócitos intratumorais em maior número de casos, quando comparado à expressão de PD-L1 em células neoplásicas, sugerindo que o sistema imune foi responsivo durante o período de imunoeedição tumoral (DUNN *et al.*, 2002; GUILLEBON *et al.*, 2015). Porém, a expressão de PD-L1 modifica conforme a progressão tumoral, e talvez por isso, não tenha sido observada imunorreatividade similar.

Outro dado relevante é em relação à presença de metástase linfonodal, com maior frequência em ambos os marcadores.

A coexpressão dos marcadores analisados foi observada em 6 casos (6,6%), e nestes a maioria pertencia ao gênero feminino e apresentava idade ≥ 50 anos, apresentando como topografia mais frequente o corpo e superposições (*Overlapping*), classificação histológica intestinal de Láuren, com estadiamento avançado do tumor primário (T3 e T4), com metástase linfonodal (N2 e N3) e grau II de diferenciação.

Em estudo de Paydas e colaboradores (2015), a coexpressão de PD-1 e PD-L1 foi associada a menor sobrevida geral média e sobrevida livre de progressão em relação aqueles sem a expressão de ambos (OS: 100 vs. 135 meses para PD-1 e 79 vs. 135 meses para PD-L1; e DFS: 107 vs. 100 meses para PD-1 e 79 vs. 100 meses para PD-L1, respectivamente), dessa forma, pode-se inferir que tais pacientes que apresentaram coexpressão dos marcadores utilizados no estudo, podem ter apresentado pouco tempo de sobrevida.

Os dados referentes à imunorreatividade de para ambos os marcadores em associação ou separadamente, demonstraram predominância do tipo histológico intestinal, o que sugere que pacientes que apresentam adenocarcinoma tipo intestinal de Laurén, podem ser mais propensos à ativação da via PD-1/PD-L1, como mecanismo tumoral de evasão da ação antitumoral do sistema imune, uma vez que na carcinogênese deste tipo histológico há etapa de inflamação crônica prévia, como gastrite crônica superficial e gastrite crônica atrófica.

De acordo com estudos em vários tipos de câncer, pacientes que apresentam positividade para PD-L1 e presença de linfócitos intratumorais possuem melhor prognóstico, maior sobrevida (KARIM *et al.*, 2009; TAUBE *et al.*, 2012; BAPTISTA *et al.*, 2016; CHO *et*

al., 2017), enquanto que para Heeren e colaboradores (2016), apenas a expressão marginal de PD-L1 foi associada a um bom prognóstico.

Em contrapartida, outros estudos demonstraram que a positividade para PD-L1 associada a presença de linfócitos intratumorais, está relacionada a um prognóstico desfavorável e menor sobrevida (HOU *et al.*, 2014; GENG *et al.*, 2015; PAYDAS *et al.*, 2015; HEEREN *et al.*, 2016; ROSENBAUM *et al.*, 2016).

Neste estudo foi realizada a análise dos marcadores no tecido adjacente ao adenocarcinoma gástrico, este grupo foi caracterizado pela maior frequência de pacientes do gênero feminino, idade ≥ 50 anos, com topografia no corpo, adenocarcinoma do tipo intestinal de Laurén, estadio tumoral avançado com metástase linfonodal e grau II de diferenciação.

Visando detectar diferenças na expressão do PD-1 em linfócitos intratumorais e linfócitos no tecido adjacente ao adenocarcinoma gástrico, foi realizado um comparativo, e observou-se que houve maior frequência na imunorreatividade de PD-1 em linfócitos intratumorais, do que em linfócitos presentes no tecido adjacente ao adenocarcinoma, tipo histológico intestinal de Laurén, estadiamento avançado e grau II de diferenciação.

No que se refere à imunorreatividade para PD-L1 no tecido adjacente ao adenocarcinoma, nenhuma imunorreatividade foi observada. Esse dado é similar ao descrito por Qing e colaboradores (2015) e Böger e colaboradores (2016), ao qual a expressão imunofenotípica para PD-L1 foi observada em células neoplásicas, mas não epitélio gástrico não neoplásico, e quando ocorreu foi em coloração fraca.

8 CONCLUSÃO

A imunorreatividade para PD-L1, parcial ou completa na membrana citoplasmática, foi observada em 8 (8,7%) dos 92 adenocarcinomas gástricos primários dessa série de casos.

Dentre os casos em que ocorreu a imunorreatividade para PD-L1, a maioria pertencia ao gênero feminino e apresentava idade ≥ 50 anos; as topografias mais frequentes foram o corpo e superposições (*overlapping*). Todos os 8 casos foram do tipo histológico intestinal de Láuren, em estadiamento avançado (T2, T3 e T4) e com metástase linfonodal (N2 e N3) e grau II de diferenciação (Moderado).

A imunorreatividade citoplasmática para PD-1 no linfócito do microambiente intratumoral (TIL) foi observada no citoplasma e ocorreu em 64 casos (69,6%).

Dentre os casos ao qual foi observada a imunorreatividade para PD-1, a maioria pertencia ao gênero masculino, apresentava idade ≥ 50 anos, com topografia mais frequente no antro e corpo, classificação de Láuren de padrão intestinal, estadiamento avançado, metástase em linfonodos e grau II de diferenciação (Moderado).

Observou-se linfócitos intratumorais PD-1 positivos em maior número de casos, quando avaliados no estroma intratumoral, em comparação aos linfócitos PD-1 positivos em estroma do tecido adjacente ao tumor.

A coexpressão dos marcadores analisados foi observada em 6 casos, e nestes a maioria pertencia ao gênero feminino e apresentavam idade ≥ 50 anos, com classificação de Láuren do tipo intestinal, estadiamento avançado (T3 e T4), com metástase linfonodal (N2 e N3) e grau II de diferenciação (Moderado).

Esses dados encontrados reforçam que pacientes que apresentam adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal de Lauren, estadiamento avançado, metástase linfonodal e grau II de diferenciação, podem estar mais propensos à ativação da via PD-1/PD-L1, sendo candidatos elegíveis para utilizar terapia com anticorpos monoclonais anti-PD-1 ou anti-PD-L1.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A fundamentação para a realização deste estudo foi esclarecer melhor a expressão diferencial/*status* e frequência das proteínas PD-1/PD-L1 no adenocarcinoma gástrico de hospital público. A proteína PD-L1 representa um biomarcador candidato indicador de prognóstico, bem como alvo terapêutico. Avaliando o risco/benefício deste estudo não intervencionista, houve benefícios potenciais para contribuir com as pesquisas clínicas, obtendo-se informações da frequência desses marcadores.

Vale ressaltar que foi avaliado um número reduzido de linfócitos intratumorais (<100) em alguns casos dessa série de adenocarcinoma. Continuamente será realizada busca de maior número de casos com infiltrado linfocitário intratumoral em grande número para imunofenotipagem e categorização da resposta imune intratumoral.

Outro ponto de análise importante foi uso de TMAs na imunoistoquímica, pois se constitui em abordagem inovadora com várias vantagens importantes em comparação com o método imunoistoquímico convencional. As principais vantagens da aplicação dessa tecnologia são o seu potencial em preservar os recursos teciduais e por ser econômica na execução de análises em larga escala. Para as futuras análises, isso permite que seja realizada uma análise simultânea de biomarcadores, principalmente imunes, nas mesmas amostras estudadas, podendo também abranger outras categorias de biomoléculas como o RNA, que pode ser extraído a partir do tecido contido no TMA. Como já mencionada a preservação, é possível também fazer análises comparativas com outras categorias de amostras, como o sangue, para se verificar o *status* de instabilidade de microsatélite e avaliar células tumorais circulantes para comparar-se com a expressão tecidual. Dessa forma, de acordo com a possibilidade técnica, executar outras análises de marcadores imunes para correlacionar o *status* de resposta e expressão de PD-1/PD-L1 viria a ser um recurso para identificar marcadores precursores contribuintes para expressão de PD-1/PD-L1.

Outra análise interessante seria a expressão de PD-1 e PD-L1 através da técnica de TMA, e posterior correlação com microrganismos que demonstram tropismo pela mucosa gástrica, a bactéria *Helicobacter pylori* e o Vírus Epstein-Barr. Esses dados também poderiam ser correlacionados com o *status* de instabilidade de microsatélites, presença ou ausência de microRNAs associados com a estimulação ou inibição da expressão de PD-1 e PD-L1.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, O. Immune checkpoints aberrations and gastric cancer; assessment of prognostic value and evaluation of therapeutic potentials. **Critical Reviews In Oncology/hematology**, [s.l.], v. 97, p.65-71, 2016.

ABE, H; KANEDA, A; FUKAYAMA, M. Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma: Use of Host Cell Machineries and Somatic Gene Mutations. **Pathobiology**, [s.l.], v. 82, n. 5, p.212-223, 2015.

AKIRA, S; UEMATSU, S; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, [s.l.], v. 124, n. 4, p.783-801, 2006.

ALVES, V.S.S; GUEDES, V.R. ANTI-PD-1 E ANTI-PD-L1: Novas perspectivas para o tratamento de diversos tipos de câncer. **Revista de Patologia do Tocantins**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 24-43, 2016.

AMARNATH, S. et al. The PD-L1-PD-1 Axis Converts Human TH1 Cells into Regulatory T Cells. **Science Translational Medicine**, [s.l.], v. 3, n. 111, p.111-120, 2011.

AMIN, M.B. et al. American Joint Committee On Cancer (Ed.). **AJCC Cancer Staging Manual**. 8. ed. [s.l.]: Springer, 2017. 1024 p.

APPLEMAN, L.J. et al. CD28 Costimulation Mediates Down-Regulation of p27kip1 and Cell Cycle Progression by Activation of the PI3K/PKB Signaling Pathway in Primary Human T Cells. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 168, n. 6, p.2729-2736, 2002.

APPLEMAN, L.J. et al. CD28 Costimulation Mediates T Cell Expansion Via IL-2-Independent and IL-2-Dependent Regulation of Cell Cycle Progression. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 164, n. 1, p.144-151, 2000.

APPLEMAN, L.J. et al. CD28 Costimulation Mediates Transcription of SKP2 and CKS1, the Substrate Recognition Components of SCFSkp2 Ubiquitin Ligase That Leads p27kip1 to Degradation. **Cell Cycle**, [s.l.], v. 5, n. 18, p.2123-2129, 2006.

ARUFFO, A; SEED, B. Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, [s.l.], v. 84, n. 23, p.8573-8577, 1987.

ATHERTON, J.C. et al. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 112, n. 1, p.92-99, 1997.

ATHERTON, J.C. et al. Mosaicism in Vacuolating Cytotoxin Alleles of *Helicobacter pylori*. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 270, n. 30, p.17771-17777, 1995.

ATHERTON, J.C. H. pylori virulence factors. **British Medical Bulletin**, [s.l.], v. 54, n. 1, p.105-120, 1998.

BACKERT, S; SELBACH, M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. **Cellular Microbiology**, [s.l.], v. 10, n. 8, p.1573-1581, 2008.

BADOUAL, C et al. Signification et intérêt clinique de l'expression de PD-1 et PD-L1 dans les tumeurs. **Médecine/sciences**, [s.l.], v. 29, n. 6-7, p.570-572, 2013.

BANG, Y.J; MURO, K; FUCHS, C.. et al. KEYNOTE-059 cohort 2: Safety and efficacy of pembrolizumab (pembro) plus 5-fluorouracil (5-FU) and cisplatin for first-line (1L) treatment of advanced gastric cancer. **Journal of Clinical Oncology** 35, 2017 (suppl; abstr 4012).

BAPTISTA, M.Z. et al. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. **Human Pathology**, [s.l.], v. 47, n. 1, p.78-84, 2016.

BARDHAN, K; ANAGNOSTOU, T; BOUSSIOTIS, V.A. The PD-1: PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 7, n. 550, p.1-17, 2016.

BARRERA, C et al. Expression of cathepsins B, L, S, and D by gastric epithelial cells implicates them as antigen presenting cells in local immune responses. **Human Immunology**, [s.l.], v. 62, n. 10, p.1081-1091, 2001.

BASS, A J. et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature**, [s.l.], v. 513, n. 7517, p.202-209, 2014.

BASTMAN, J.J. et al. Tumor-Infiltrating T Cells and the PD-1 Checkpoint Pathway in Advanced Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 101, n. 7, p.2863-2873, 2016.

BAÚ, F.C; HUTH, A. Fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento do câncer gástrico e de esôfago. **Revista Contexto e Saúde**, Ijuí, v. 11, n. 21, p.16-24, 2011.

BERGER, R. et al. Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of CT-011, a Humanized Antibody Interacting with PD-1, in Patients with Advanced Hematologic Malignancies. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 14, n. 10, p.3044-3051, 2008.

BERSTAD, A.E. et al. Increased Mucosal Production of Monomeric IgA1 but No IgA1 Protease Activity in *Helicobacter pylori* Gastritis. **The American Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 155, n. 4, p.1097-1104, 1999.

BESWICK, E.J. et al. Expression of the Programmed Death Ligand 1, B7-H1, on Gastric Epithelial Cells after *Helicobacter pylori* Exposure Promotes Development of CD4+ CD25+ FoxP3+ Regulatory T Cells. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 75, n. 9, p.4334-4341, 2007.

BIVONA, T.G. et al. Phospholipase C γ activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. **Nature**, [s.l.], v. 424, n. 6949, p.694-698, 2003.

BOGOVSKI, P; BOGOVSKI, S. Animal Species in which N-nitroso compounds induce cancer. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 27, n. 4, p.471-474, 1981.

BÖGER, C. et al. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. **Oncotarget**, [s.l.], v. 7, n. 17, p.24269-24283, 2016.

BOONEN, G.J. et al. CD28 induces cell cycle progression by IL-2-independent down-regulation of p27kip1 expression in human peripheral T lymphocytes. **European Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 29, n. 3, p.789-798, 1999.

BOYERINAS, B. et al. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab (MSB0010718C) on Human Tumor Cells. **Cancer Immunology Research**, [s.l.], v. 3, n. 10, p.1148-1157, 2015.

BRAHMER, J.R. et al. Phase I Study of Single-Agent Anti-Programmed Death-1 (MDX-1106) in Refractory Solid Tumors: Safety, Clinical Activity, Pharmacodynamics, and Immunologic Correlates. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 28, n. 19, p.3167-3175, 2010.

BRAHMER, J.R. et al. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 366, n. 26, p.2455-2465, 2012.

BRITTO, A.V. Câncer de estômago: fatores de risco. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.7-13, 1997.

BURNET, M. Cancer—A Biological Approach: I. The Processes Of Control. II. The Significance of Somatic Mutation. **British Medical Journal**, London, v. 1, n. 5022, p.779-786, 1957.

BUSUTTIL, R. A. et al. A Signature Predicting Poor Prognosis in Gastric and Ovarian Cancer Represents a Coordinated Macrophage and Stromal Response. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 20, n. 10, p.2761-2772, 2014.

BUTTE, M.J. et al. Programmed Death-1 Ligand 1 Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses. **Immunity**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.111-122, 2007.

CAPOFERRO, R; TORGERSEN, O. The effect of hypertonic saline on the uptake of tritiated 7,12-dimethylbenz(a)anthracene by the gastric mucosa. **Scandinavian Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.343-349, 1974.

CARNEIRO, F. et al. Model of the early development of diffuse gastric cancer in E-cadherin mutation carriers and its implications for patient screening. **The Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 203, n. 2, p.681-687, 2004.

CARRANO, A.C. et al. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. **Nature Cell Biology**, [s.l.], v. 1, n. 4, p.193-199, 1999.

CARRENO, B.M; COLLINS, M. The B7 family of ligands and its receptors: New Pathways for Costimulation and Inhibition of Immune Responses. **Annual Review Of Immunology**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.29-53, 2002.

CARVALHO, J.B. et al. Fatores de risco socioambientais e nutricionais envolvidos na carcinogênese gástrica. **Revista Paraense de Medicina**, Belém, v. 25, n. 2/3, p.1-9, 2011.

CÉSAR, A.C.G; SILVA, A.E; TAJARA, E.H. Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese gástrica. **Arquivos de Gastroenterologia**, [s.l.], v. 39, n. 4, p.253-259, 2002.

CHEMNITZ, J. M. et al. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 173, n. 2, p.945-954, 2004.

CHEN, L. Co-inhibitory molecules of the B7–CD28 family in the control of T-cell immunity. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 4, n. 5, p.336-347, 2004.

CHO, J. et al. Programmed cell death-ligand 1 expression predicts survival in patients with gastric carcinoma with microsatellite instability. **Oncotarget**, [s.l.], p.13320-13328, 2017.

CORREA, P; HAENSZEL, W; CUELLO, C. A model for gastric cancer epidemiology. **The Lancet**, [s.l.], v. 306, n. 7924, p.58-60, 1975.

CORREA, Pelayo. A Human Model of Gastric Carcinogenesis. **American Association For Cancer Research**, [s.l.], v. 48, n. 13, p.3554-3560, 1988.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, [s.l.], v. 420, n. 6917, p.860-867, 2002.

COVER, T.L; DOOLEY, C.P; BLASER, M.J. Characterization of and human serologic response to proteins in Helicobacter pylori broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 58, n. 3, p.603-610, 1990.

COVER, T.L.; BLANKE, S.R. Helicobacter pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 3, n. 4, p.320-332, 2005.

CURRAN, M.A. et al. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 107, n. 9, p.4275-4280, 2010.

D'ANGELO, G. et al. Microarray analysis in gastric cancer: A review. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 20, n. 34, p.11972-11976, 2014.

DAS, S. et al. Expression of B7-H1 on Gastric Epithelial Cells: Its Potential Role in Regulating T Cells during Helicobacter pylori Infection. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 176, n. 5, p.3000-3009, 2006.

DE VITA, V.T.J; HELLMAN, S; ROSENBERG, S.A. Cancer – Principles and practice of oncology. 5. ed. Philadelphia: **Lippincott-Raven**; v.1, 1997.

DONG, H et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 5, n. 12, p.1365-1369, 1999.

DONG, M et al. Expression and prognostic roles of PIK3CA, JAK2, PD-L1, and PD-L2 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. **Human Pathology**, [s.l.], v. 53, p.25-34, 2016.

DOORN, L.J.V. et al. Typing of *Helicobacter pylori* vacA gene and detection of cagA gene by PCR and reverse hybridization. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 36, n. 5, p.1271-1276, 1998.

DUNN, G.P. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature Immunology**, [s.l.], v. 3, n. 11, p.991-998, 2002.

EBINU, J.O. et al. RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. **Blood**, [s.l.], v. 95, n. 10, p.3199-3203, 2000.

EBINU, J.O. et al. RasGRP, a Ras Guanyl Nucleotide- Releasing Protein with Calcium- and Diacylglycerol-Binding Motifs. **Science**, [s.l.], v. 280, n. 5366, p.1082-1086, 15 maio 1998.

EPPIHIMER, MJ et al. Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. **Microcirculation**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.133-145, 2009.

FEHLINGS, M. et al. Comparative Analysis of the Interaction of *Helicobacter pylori* with Human Dendritic Cells, Macrophages, and Monocytes. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 80, n. 8, p.2724-2734, 2012.

FERRASI, A.C. **Análise das alterações genéticas e epigenéticas dos tumores gástricos infectados por *Helicobacter pylori* e Vírus Epstein-Barr**. 2007. 68 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

FLEMMING, A. Cancer: PD-1 makes waves in anticancer immunotherapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 11, n. 8, p.601-601, 2012.

FLIES, D.B. et al. Blockade of the B7-H1/PD-1 Pathway for Cancer Immunotherapy. **Yale Journal Of Biology And Medicine**, [s.l.], v. 84, n. 4, p.409-421, 2011.

FOCK, K.M. Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.250-260, 2014.

FRANCISCO, L.M.; SAGE, P.T.; SHARPE, A.H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. **Immunological Reviews**, [s.l.], v. 236, n. 1, p.219-242, 2010.

FREEMAN, G.J. et al. Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. **The Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 192, n. 7, p.1027-1034, 2000.

FREITAS, A.P.O. et al. Neoplasias malignas: uma abordagem sobre câncer gástrico. In: 2º Congresso Internacional De Atividade Física, Nutrição e Saúde, 2., 2016, Aracajú. **Resumo...**. Aracajú: Unit, 2016. v. 1, p. 1 - 2.

FUCHS, C. et al. P-105 * Pembrolizumab (MK-3475) for patients with recurrent or metastatic gastric or gastroesophageal junction (GEJ) adenocarcinoma: The phase 2 KEYNOTE-059 study. **Annals Of Oncology**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.29-29, 2015.

FUCHS, C.S. 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**, [s.l.], v. 35, n. 15, p. 4003-4003, 2017.

GAJEWSKI, T.F et al. Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment. **Current Opinion In Immunology**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.268-276, 2013.

GAMEIRO, J; NAGIB, P; VERINAUD, L. The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation. **Cell Adhesion & Migration**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.382-390, 2010.

GANDINI, F. **Os diferentes tipos de gastrite e sua relação com o uso de medicamentos**. 2004. 51 f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Curso de Farmácia, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2004.

GAO, Q. et al. Overexpression of PD-L1 Significantly Associates with Tumor Aggressiveness and Postoperative Recurrence in Human Hepatocellular Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.971-979, 2009.

GARÓFOLO, A. et al. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Revista de Nutrição**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.491-505, 2004.

GENG, Y. et al. Expression of costimulatory molecules B7-H1, B7-H4 and Foxp3+ Tregs in gastric cancer and its clinical significance. **International Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 20, n. 2, p.273-281, 2015.

GLOBOCAN. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence world in 2012. Disponível em <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>, acessado em: 23/01/2017.

GO, M.F; CROWE, S.E. Virulence and pathogenicity of helicobacter pylori. **Gastroenterology Clinics Of North America**, [s.l.], v. 29, n. 3, p.649-670, 2000.

GONÇALVES, P.N.J. **Exercício físico e Sistema imunológico**. 2014. 43 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

GONZÁLEZ, C.A; SALA, N; CAPELLÁ, G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 100, n. 3, p.249-260, 2002.

GREEN, M.R. et al. Constitutive AP-1 Activity and EBV Infection Induce PD-L1 in Hodgkin Lymphomas and Posttransplant Lymphoproliferative Disorders: Implications for Targeted Therapy. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 18, n. 6, p.1611-1618, 2012.

GROS, A. et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8+ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 124, n. 5, p.2246-2259, 2014.

GUILLEBON, E. Anti program death-1/anti program death-ligand 1 in digestive cancers. **World Journal Of Gastrointestinal Oncology**, [s.l.], v. 7, n. 8, p.95-101, 2015.

HANAHAN, D; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [s.l.], v. 144, n. 5, p.646-674, 2011.

HEEREN, A.M. et al. Prognostic effect of different PD-L1 expression patterns in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. **Modern Pathology**, [s.l.], v. 29, n. 7, p.753-763, 2016.

HIGASHI, H. et al. SHP-2 Tyrosine Phosphatase as an Intracellular Target of Helicobacter pylori CagA Protein. **Science**, [s.l.], v. 295, n. 5555, p.683-686, 2001.

HINO, R. et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. **Cancer**, [s.l.], v. 116, n. 7, p.1757-1766, 2010.

HOU, J. et al. Correlation between infiltration of FOXP3+ regulatory T cells and expression of B7-H1 in the tumor tissues of gastric cancer. **Experimental And Molecular Pathology**, [s.l.], v. 96, n. 3, p.284-291, 2014.

HUMAR, B; GUILFORD, P. Hereditary diffuse gastric cancer: A manifestation of lost cell polarity. **Cancer Science**, [s.l.], v. 100, n. 7, p.1151-1157, 2009.

IARC, Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Schistosomes, liver lukes and Helicobacter pylori. **Lyon**, p.1-241, 1994.

IIZASA, H. et al. Epstein-Barr Virus (EBV)-associated Gastric Carcinoma. **Viruses**, [s.l.], v. 4, n. 12, p.3420-3439, 2012.

INCA. Estimativa 2016/2017. Disponível em <
<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/sobre-as-estimativas.asp> > Acesso em: 01/02/2016.

ISHIDA, Y. et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **The Embo Journal**, [s.l.], v. 11, n. 11, p.3887-3895, 1992.

ISRAEL, D.A; PEEK, R.M. Review article: pathogenesis of Helicobacter pylori-induced gastric inflammation. **Alimentary Pharmacology And Therapeutics**, [s.l.], v. 15, n. 9, p.1271-1290, 2001.

JOSEPH, R.W. et al. Lichenoid Dermatitis in Three Patients with Metastatic Melanoma Treated with Anti-PD-1 Therapy. **Cancer Immunology Research**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.18-22, 2014.

KARIM, R. et al. Tumor-Expressed B7-H1 and B7-DC in Relation to PD-1+ T-Cell Infiltration and Survival of Patients with Cervical Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 15, n. 20, p.6341-6347, 2009.

KARIMI, P. et al. Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, [s.l.], v. 23, n. 5, p.700-713, 2014.

KARIN, M; GRETEN, F.R. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 5, n. 10, p.749-759, 2005.

KEDMI, M; AVIGDOR, A; NAGLER, A. Anti-PD-1-Targeted Therapies Focusing on Lymphatic Malignancies: Biological Rationale, Clinical Challenges and Opportunities. **Acta Haematologica**, [s.l.], v. 133, n. 2, p.129-135, 2014.

KEIR, M.E. et al. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. **Annual Review Of Immunology**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.677-704, 2008.

KEIR, M.E. et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. **The Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 203, n. 4, p.883-895, 2006.

KINTER, A.L. et al. The Common-Chain Cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 Induce the Expression of Programmed Death-1 and Its Ligands. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 181, n. 10, p.6738-6746, 2008.

KODAMA, K. et al. Gastric juice nitrite and vitamin C in patients with gastric cancer and atrophic gastritis: is low acidity solely responsible for cancer risk? **European Journal Of Gastroenterology & Hepatology**, [s.l.], v. 15, n. 9, p.987-993, 2003.

KODAMA, M. et al. Effect of rice and salty rice diets on the structure of mouse stomach. **Nutrition And Cancer**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.135-147, 1984.

KONO, S; HIROHATA, T. Nutrition and stomach cancer. **Cancer Causes & Control: CCC**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.41-55, 1996.

LADEIRA, M.S.P; SALVADORI, D.M.F; RODRIGUES, M.A.M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s.l.], v. 39, n. 4, p.335-342, 2003.

LARSEN, C.P. et al. Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. **Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 152, n. 11, p.5208-5219, 1994.

LATCHMAN, Y. et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **Nature Immunology**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.261-268, 2001.

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 Pathologica Et Microbiologica Scandinavica**, [s.l.], v. 64, p.31-49, 1965.

LEBIEN, T. W; TEDDER, T. B lymphocytes: how they develop and function. **Blood**, [s.l.], v. 112, n. 5, p.1570-1580, 2008.

LEE, K; HWANG, H; NAM, K.T. Immune Response and the Tumor Microenvironment: How They Communicate to Regulate Gastric Cancer. **Gut And Liver**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.131-139, 2014.

LI, P. et al. Amino acids and immune function. **British Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 98, n. 02, p.237-252, 2007.

LINA, T.T. et al. Helicobacter pylori cag Pathogenicity Island's Role in B7-H1 Induction and Immune Evasion. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.1-16, 2015.

LIU, J. et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. **Blood**, [s.l.], v. 110, n. 1, p.296-304, 2007.

LUCAS, B. et al. Adoptive Transfer of CD4+ T Cells Specific for Subunit A of Helicobacter pylori Urease Reduces H. pylori Stomach Colonization in Mice in the Absence of Interleukin-4 (IL-4)/IL-13 Receptor Signaling. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 69, n. 3, p.1714-1721, 2001.

LUCKHEERAM, R.V. et al. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. **Clinical And Developmental Immunology**, [s.l.], v. 2012, p.1-12, 2012.

MAHONEY, K.M; RENNERT, P.D; FREEMAN, G.J. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 14, n. 8, p.561-584, 2015.

MALHEIROS, C.A. et al. Ecoendoscopia na avaliação pré-operatória do estádio em doentes com câncer gástrico: correlação com os achados cirúrgicos e/ou histopatológicos. **Arquivos de Gastroenterologia**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.22-27, 2008.

MARSHALL, B. Helicobacter pylori: 20 years on. **Clinical Medicine**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.147-152, 2002.

MARSHALL, B.J; WARREN, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **The Lancet**, [s.l.], v. 323, n. 8390, p.1311-1315, 1984.

MAZANET, M.M; HUGHES, C.C.W. B7-H1 Is Expressed by Human Endothelial Cells and Suppresses T Cell Cytokine Synthesis. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 169, n. 7, p.3581-3588, 2002.

MELERO, I. et al. Agonist Antibodies to TNFR Molecules That Costimulate T and NK Cells. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 19, n. 5, p.1044-1053, 2013.

CRUVINEL, W.M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [s.l.], v. 50, n. 4, p.434-447, 2010.

MITCHELL, P. et al. Chronic Exposure to Helicobacter pylori Impairs Dendritic Cell Function and Inhibits Th1 Development. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 75, n. 2, p.810-819, 2006.

MITTAL, D. et al. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. **Current Opinion In Immunology**, [s.l.], v. 27, p.16-25, 2014.

MONTECUCCO, C; RAPPUOLI, R. Living dangerously: how Helicobacter pylori survives in the human stomach. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 2, n. 6, p.457-466, 2001.

MUNÕZ, N; FRANCESCHI, S. Epidemiology of gastric cancer and perspectives for prevention. **Salud Publica de México**, [s.l.], v. 39, n. 4, p.318-330, 1997.

MURO, K et al. Pembrolizumab for patients with PD-L1-positive advanced gastric cancer (KEYNOTE-012): a multicentre, open-label, phase 1b trial. **The Lancet Oncology**, [s.l.], v. 17, n. 6, p.717-726, 2016.

MURPHY, G et al. Meta-analysis Shows That Prevalence of Epstein–Barr Virus-Positive Gastric Cancer Differs Based on Sex and Anatomic Location. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 137, n. 3, p.824-833, 2009.

MURPHY, A; KELLY, R.J. Immunotherapy in Upper GI Malignancies. **Current Treatment Options In Oncology**, [s.l.], v. 16, n. 5, p.1-20, 2015.

NAKANISHI, J. et al. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, [s.l.], v. 56, n. 8, p.1173-1182, 2006.

NGIOW, S.F. et al. Anti-TIM3 Antibody Promotes T Cell IFN-Mediated Antitumor Immunity and Suppresses Established Tumors. **Cancer Research**, [s.l.], v. 71, n. 10, p.3540-3551, 2011.

NICCOLAI, E et al. Gastric cancer and the epoch of immunotherapy approaches. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 21, n. 19, p.5778-5793, 2015.

NIEDERLE, R; MOREIRA, A.C. O perigo pode estar no estômago: helicobacter pylori – aspectos epidemiológicos, patológicos, de tratamento e preventivos. **Revista Contexto & Saúde**, Ijuí, v. 10, n. 19, p.59-66, 2010.

NIVOLUMAB. Disponível em <<https://clinicaltrials.gov> (NCT02267343)>. Acessado em 20/03/2016.

NOBILI, S et al. Genomic and genetic alterations influence the progression of gastric cancer. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 17, n. 3, p.290-299, 2011.

NORMANTON, M; MARTI, LC. Current data on IL-17 and Th17 cells and implications for graft versus host disease. **Einstein (são Paulo)**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.237-246, 2013.

NOWICKI, T.S.; ANDERSON, J.L.; FEDERMAN, N. Prospective immunotherapies in childhood sarcomas: PD-1/PD-L1 blockade in combination with tumor vaccines. **Pediatric Research**, [s.l.], v. 79, n. 3, p.371-377, 2015.

ODENBREIT, S. et al. Translocation of Helicobacter pylori CagA into Gastric Epithelial Cells by Type IV Secretion. **Science**, [s.l.], v. 287, n. 5457, p.1497-1500, 2000.

OESTREICH, K.J. et al. NFATc1 Regulates PD-1 Expression upon T Cell Activation. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 181, n. 7, p.4832-4839, 2008.

OHGAKI, H et al. Study of the promoting effect of sodium chloride on gastric carcinogenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in inbred Wistar rats. **Gan**, [s.l.], v. 75, n. 12, p.1053-1057, 1984.

OHIGASHI, Y. et al. Clinical Significance of Programmed Death-1 Ligand-1 and Programmed Death-1 Ligand-2 Expression in Human Esophageal Cancer. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 11, n. 8, p.2947-2953, 2005.

OHTSU, A. et al. P-106 * Pembrolizumab (MK-3475) versus paclitaxel as second-line therapy for advanced gastric or gastroesophageal junction (GEJ) adenocarcinoma: Randomized, open-label, phase 3 KEYNOTE-061 study. **Annals Of Oncology**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.29-30, 2015.

OKAZAKI, T. et al. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 98, n. 24, p.13866-13871, 6 nov. 2001.

OTT, P.A.; HODI, F. Stephen. The B7-H1/PD-1 pathway in cancers associated with infections and inflammation: opportunities for therapeutic intervention. **Chinese Clinical Oncology**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.1-7, 2013.

PARKIN, D.M; BRAY, F.I; DEVESA, S.S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **European Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 37, p.4-66, 2001.

PARRY, R.V. et al. CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. **Molecular And Cellular Biology**, [s.l.], v. 25, n. 21, p.9543-9553, 2005.

PARSA, A.T et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.84-88, 2006.

PARSONNET, J. et al. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection. **Gut**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.297-301, 1997.

PATSOUKIS, N, et al. PD-1 Increases PTEN Phosphatase Activity While Decreasing PTEN Protein Stability by Inhibiting Casein Kinase 2. **Molecular And Cellular Biology**, [s.l.], v. 33, n. 16, p.3091-3098, 2013.

PATSOUKIS, N. et al. Selective Effects of PD-1 on Akt and Ras Pathways Regulate Molecular Components of the Cell Cycle and Inhibit T Cell Proliferation. **Science Signaling**, [s.l.], v. 5, n. 230, p.1-30, 2012.

PAYDAS, S. et al. Programmed death-1 (PD-1), programmed death-ligand 1 (PD-L1), and EBV-encoded RNA (EBER) expression in Hodgkin lymphoma. **Annals Of Hematology**, [s.l.], v. 94, n. 9, p.1545-1552, 2015.

PEEK, R.M.; BLASER, M.J. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.28-37, 2002.

PENTCHEVA-HOANG, T; CORSE, E; ALLISON, J,P. Negative regulators of T-cell activation: potential targets for therapeutic intervention in cancer, autoimmune disease, and persistent infections. **Immunological Reviews**, [s.l.], v. 229, n. 1, p.67-87, 2009.

POLANCZYK, M.J. et al. Estrogen-mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. **Journal Of Neuroscience Research**, [s.l.], v. 84, n. 2, p.370-378, 2006.

POLK, D.B; PEEK, R.M. Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.403-414, 2010.

POPPE, M. et al. Phosphorylation of Helicobacter pylori CagA by c-Abl leads to cell motility. **Oncogene**, [s.l.], v. 26, n. 24, p.3462-3472, 2006.

POREMBA, C. et al. Frequency and spectrum of p53 mutations in gastric cancer: a molecular genetic and immunohistochemical study. **Virchows Arch.**, v.426, p.447-455, 1995.

PUZZONI, M. et al. The Immune Revolution in Gastrointestinal Tumours: Leading the Way or Just Following?. **Targeted Oncology**, [s.l.], v. 11, n. 5, p.593-603, 2016.

QING, Y. et al. Upregulation of PD-L1 and APE1 is associated with tumorigenesis and poor prognosis of gastric cancer. **Drug Design, Development And Therapy**, [s.l.], p.901-909, 2015.

QUAIL, D.F; JOYCE, J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 19, n. 11, p.1423-1437, 2013.

RIBAS, A. Tumor Immunotherapy Directed at PD-1. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 366, n. 26, p.2517-2519, 2012.

RICKINSON, A.B; KIEFF, E. Epstein–Barr virus. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., editors. 5th. Vol. 2. Lippincott–Williams e Wilkins; Philadelphia, PA, USA: 2007. p. 2655–2700.

RIELLA, L.V. et al. Role of the PD-1 Pathway in the Immune Response. **American Journal Of Transplantation**, [s.l.], v. 12, n. 10, p.2575-2587, 2012.

RILEY, J.L. PD-1 signaling in primary T cells. **Immunological Reviews**, [s.l.], v. 229, n. 1, p.114-125, 2009.

ROEMER, M.G.M. et al. PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 34, n. 23, p.2690-2697, 2016.

ROLLINS, B.J. Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. **European Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 42, n. 6, p.760-767, 2006.

ROOSE, J. P. et al. A Diacylglycerol-Protein Kinase C-RasGRP1 Pathway Directs Ras Activation upon Antigen Receptor Stimulation of T Cells. **Molecular And Cellular Biology**, [s.l.], v. 25, n. 11, p.4426-4441, 2005.

ROSENBAUM, M.W. et al. PD-L1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, BRAF mutation, medullary morphology and cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes. **Modern Pathology**, [s.l.], v. 29, n. 9, p.1104-1112, 2016.

ROTHSCHILD, S. et al. Cancer immunology – development of novel anti-cancer therapies. **Swiss Medical Weekly**, [s.l.], p.1-10, 2015.

RUDI, J. et al. Direct determination of Helicobacter pylori vacA genotypes and cagA gene in gastric biopsies and relationship to gastrointestinal diseases. **The American Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 94, n. 6, p.1525-1531, 1999.

SABATIER, R. et al. Prognostic and predictive value of PD-L1 expression in breast cancer. **Oncotarget**, [s.l.], v. 6, n. 7, p.5449-5464, 2014.

SAKAKURA, K; CHIKAMATSU, K. Immune suppression and evasion in patients with head and neck cancer. **Advances In Cellular And Molecular Otolaryngology**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.1-13, 2013.

SANTOS, A.S. et al. Adenocarcinoma gástrico. **Arquivos Médicas dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.1-3, 2015.

SCHEEL, A.H. et al. Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas. **Modern Pathology**, [s.l.], v. 29, n. 10, p.1165-1172, 2016.

SHINOZAKI-USHIKU, A; KUNITA, A; FUKAYAMA, M. Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer (Review). **International Journal Of Oncology**, [s.l.], v. 46, n. 4, p.1421-1434, 2015.

SILVA, V.C.S; FELÍCIO, D.C. Fatores de risco para o câncer gástrico em grupos de classe sócioeconômico baixa: revisão literaria. **Revista de Iniciação Científica da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 6, n. 1, p.3-10, 2016.

SOUZA, B.B; ARAÚJO, N. C; YAMANAKA, A. Câncer gástrico avançado: acurácia da biópsia endoscópica. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 12, n. 3, p.299-305, 2013.

STEVENS, A; LOWE, J. Patologia. 2. ed. São Paulo: **Editora Manole**, p. 221-224, 1998.

SUAREZ, G; REYES, V.E; BESWICK, E.J. Immune response to H pylori. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 12, n. 35, p.5593-5598, 2006.

SZNOL, M.; CHEN, L.. Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the Treatment of Advanced Human Cancer. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 19, n. 5, p.1021-1034, 2013.

TABERNERO, J. et al. KEYNOTE-062: Phase III study of pembrolizumab (MK-3475) alone or in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone as first-line therapy for advanced gastric or gastroesophageal junction (GEJ) adenocarcinoma. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.185-185, 2016.

TAHARA, E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. **IARC Scientific Publications**, [s.l.], v. 1, n. 157, p.327-349, 2004.

TAKAHASHI, M.; KOKUBO, T; FURUKAWA, F. Effects of sodium chloride, saccharin, phenobarbital and aspirin on gastric carcinogenesis rats after inhibition with N-methyl-N-nitro-N-nitroso guanidine. **Gann**, [s.l.], v. 1, n. 75, p.494-501, 1984.

TAMURA, T. *et al.* Programmed Death-1 Ligand-1 (PD-L1) Expression Is Associated with the Prognosis of Patients with Stage II/III Gastric Cancer. **Anticancer Research**, [s.l.], v. 35, n. 10, p.5369-5376, 2015.

TAN, P; YEOH, K.G. Genetics and Molecular Pathogenesis of Gastric Adenocarcinoma. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 149, n. 5, p.1153-1162, 2015.

TATEMATSU, M.; TAKAHASHI, M; FUKUSHIMA, S. Effects in rats of sodium chloride on experimental gastric cancer induced by N-methyl N-nitro-N-nitrosoguanidine or 4-nitroquinoline 1-oxide. **Journal of the National Cancer Institute**, [s.l.], v. 55, n. 1, p.101-106, 1975.

TAUBE, J.M. et al. Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1 Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape. **Science Translational Medicine**, [s.l.], v. 4, n. 127, p.127-137, 2012.

TERRA, R. et al. Efeito do exercício no sistema imune: resposta, adaptação e sinalização celular. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.208-214, 2012.

TESTERMAN, T.L; MORRIS, J. Beyond the stomach: An updated view of Helicobacter pylori pathogenesis, diagnosis, and treatment. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 20, n. 36, p.12781-12808, 2014.

TOPALIAN, S.L. et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 366, n. 26, p.2443-2454, 2012.

- TOPALIAN, S.L; DRAKE, C.G; PARDOLL, D.M. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. **Current Opinion In Immunology**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.207-212, 2012.
- TORRES, J; PULIDO, R. The Tumor Suppressor PTEN Is Phosphorylated by the Protein Kinase CK2 at Its C Terminus. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 276, n. 2, p.993-998, 2000.
- TSENG, S. et al. B7-Dc, a New Dendritic Cell Molecule with Potent Costimulatory Properties for T Cells. **The Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 193, n. 7, p.839-846, 2001.
- TUMMURU, M.K; COVER, T.L; BLASER, M.J. Cloning and expression of a highmolecular-mass major antigen of Helicobacter pylori: evidence of linkage to cytotoxin production. **Infect Immun**, [s.l.], v. 1, n. 5, p.1799-809, 1993.
- TUMMURU, M. K; SHARMA, S.A.; BLASER, M.J. Helicobacter pylori picB, a homologue of the Bordetella pertussis toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 18, n. 5, p.867-876, 1995.
- TURVEY, S.E.; BROIDE, D.H. Innate immunity. **Journal Of Allergy And Clinical Immunology**,[s.l.], v. 125, n. 2, p.24-32, 2010.
- VAZQUEZ, F. et al. Phosphorylation of the PTEN Tail Regulates Protein Stability and Function. **Molecular And Cellular Biology**, [s.l.], v. 20, n. 14, p.5010-5018, 2000.
- VIEIRA, T. et al. Sarcomatoid lung carcinomas show high levels of programmed death ligand-1 (PD-L1) and strong immune-cell infiltration by TCD3 cells and macrophages. **Lung Cancer**, [s.l.], v. 98, p.51-58, 2016.
- WANG, X. et al. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. **Oncotargets And Therapy**, [s.l.], v. 9, p.5023-5039, 2016.
- WARD, M.H; SINHA, R; HEINEMAN, E.F. Risk of adenocarcinoma of the stomach and esophagus with meat cooking method and doneness preference. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 71, n. 1, p.14-19, 1997.
- WELIN, M et al. Statistical Model of the Interactions Between Helicobacter pylori Infection and Gastric Cancer Development. **Helicobacter**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.72-78, 2003.
- WHERRY, E.J. T cell exhaustion. **Nature Immunology**, [s.l.], v. 131, n. 6, p.492-499, 2011.
- WOO, S.R. et al. Immune Inhibitory Molecules LAG-3 and PD-1 Synergistically Regulate T-cell Function to Promote Tumoral Immune Escape. **Cancer Research**, [s.l.], v. 72, n. 4, p.917-927, 2011.
- WU, C. et al. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. **Acta Histochemica**, [s.l.], v. 108, n. 1, p.19-24, 2006.

WU, Y. et al. Comprehensive genomic meta-analysis identifies intra-tumoural stroma as a predictor of survival in patients with gastric cancer. **Gut**, [s.l.], v. 62, n. 8, p.1100-1111, 2012.

WU, Y.Y.. et al. Increased programmed death-ligand-1 expression in human gastric epithelial cells in Helicobacter pylori infection. **Clinical & Experimental Immunology**, [s.l.], v. 161, n. 3, p.551-559, 2010.

XIE, L. et al. Association between dietary nitrate and nitrite intake and site-specific cancer risk: evidence from observational studies. **Oncotarget**, [s.l.], v. 7, n. 35, p.56915-56932, 2016.

YAMADA, Y. *et al.* A phase I dose expansion trial of avelumab (MSB0010718C), an anti-PD-L1 antibody, in Japanese patients with advanced gastric cancer. **J Clin Oncol**, 33, 2015.

YAMAZAKI, T. et al. Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 169, n. 10, p.5538-5545, 2002.

YAO, S; ZHU, Y; CHEN, L. Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 12, n. 2, p.130-146, 2013.

YOKOSUKA, T et al. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. **The Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 209, n. 6, p.1201-1217, 2012.

YUAN, J. et al. Programmed death-ligand-1 expression in advanced gastric cancer detected with RNA in situ hybridization and its clinical significance. **Oncotarget**, [s.l.], v. 7, n. 26, p.39671-39679, 2016.

ZHANG, L et al. Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression on gastric cancer and its relationship with clinicopathologic factors. **International Journal Of Clinical And Experimental Pathology**, [s.l.], v. 8, n. 9, p.11084-11091, 2015.

ZILBERSTEIN, B. et al. Consenso brasileiro sobre câncer gástrico: diretrizes para o câncer gástrico no Brasil. **Abcd. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.2-6, 2013.