



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DE MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

ADRIANO CARNEIRO DA COSTA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CATEPSINA S NOS TUMORES GÁSTRICOS E
SUA CORRELAÇÃO COM INFECÇÃO POR *HELICOBACTER PYLORI***

Recife
2021

ADRIANO CARNEIRO DA COSTA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CATEPSINA S NOS TUMORES GÁSTRICOS E
SUA CORRELAÇÃO COM INFECÇÃO POR *HELICOBACTER PYLORI***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia.

Área de concentração: Cirurgia Clínica e Experimental

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Coorientador: Prof. Dr. José Luiz Figueiredo

Recife
2021

C837a Costa, Adriano Carneiro da
Análise da expressão de catepsina S nos tumores gástricos e sua correlação com infecção por *Helicobacter pylori* / Adriano Carneiro da Costa. – 2021.
80 f.

Orientador: Álvaro Antônio Bandeira Ferraz.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas- CCM. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Neoplasias gástricas. 2. Catepsina S. 3. *Helicobacter pylori*. 4. Gastrite. 5. Biomarcador. 6. Imuno-Histoquímica. I. Ferraz, Álvaro Antônio Bandeira (Orientador). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2021-141)

ADRIANO CARNEIRO DA COSTA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CATEPSINA S NOS TUMORES GÁSTRICOS E
SUA CORRELAÇÃO COM INFECÇÃO POR *HELICOBACTER PYLORI***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Cirurgia do Centro de Ciências Médicas da
Universidade Federal de Pernambuco como parte
dos requisitos para a obtenção do título de Doutor
em Cirurgia.

Área de concentração: Cirurgia Clínica e
Experimental

Aprovado em: 12 / 05 / 2021

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Flávio Kreimer (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Esdras Marques (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Vivian Resende (Examinador Externo)
Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Maria Inês Remígio (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico essa tese de doutorado a **Deus** e a **todas** as pessoas que me ajudaram a realizar esse sonho. Não foi fácil sair de uma pequena cidade, e sendo de uma família simples, conseguir defender uma tese de doutorado.

Sei que minha mãe, **Auri Ferreira da Costa**, e meu pai, **Deocleciano Carneiro**, não estão mais entre nós, mas sei que estão felizes, por todo esforço que fizeram para me formar. Agradeço aos meus irmãos, **Tarcísio Carneiro da Costa**, **Eudes Carneiro da Costa**, **Italo Carneiro da Costa**, **Livaldino Carneiro da Costa** e **Leolina Carneiro da Costa**, e deixo aqui o registro de ser a primeira pessoa da minha cidade, chamada Brejo dos Santos no sertão da Paraíba, a ter feito doutorado.

Dedico essa tese ao meu amor, minha metade, minha esposa e minha eterna namorada, **Camila Ramos Martins**.

AGRADECIMENTOS

Em especial, ao *Dr. Prof. Álvaro Ferraz*, por ter sido meu orientador e por ter acreditado na minha capacidade.

A meu coorientador, *Dr. Prof. José Luiz Figueiredo*, pela escolha do tema e pelas orientações.

À *Fernando Santa Cruz, Márcia Virgínio de Araújo e Mércia Virgínio de Araújo*, pela ajuda em formatar a tese.

Ao Professor Dr. Ademar Lopes, pela grande ajuda na minha jornada.

A cada *Professor, Colega e Amigo* que passou pela minha vida.

Agradeço a todos os *funcionários* da Pós-graduação por sempre ajudar da melhor forma na construção deste sonho.

RESUMO

O Câncer gástrico é o quarto câncer mais comum e a segunda causa de morte por câncer no mundo. A catepsina S (Cat S) é uma proteína expressa em algumas células epiteliais, que está associada à invasão local, metástase e recorrência do câncer. O objetivo foi analisar e comparar a expressão do biomarcador catepsina S entre gastrite e câncer gástrico, através de reação de imunohistoquímica. Estudo transversal envolvendo 92 pacientes, dos quais 42, com CG e 50 portadores de gastrite. Os portadores de gastrite foram subdivididos em dois grupos: com pesquisa positiva ou negativa para *H. pylori*. Os pacientes com CG, foi subdividido em dois grupos: precoce (estádio I) e avançado (estádio III). As biópsias dos pacientes de CG foram obtidas através de ressecção cirúrgica, e as amostras com gastrite através de múltiplas biópsias por endoscopia digestiva alta. As amostras foram enviadas para estudo de coloração imunohistoquímica para avaliar a expressão de Cat S. Quando comparamos da expressão de Cat S entre câncer gástrico e gastrite, observou-se que nas gastrites, 38% apresentam expressão negativa e 48% expressão francamente positiva, e apenas uma minoria dos casos 14% apresentam expressão positiva. Nos pacientes com câncer gástrico, 33,3 % apresentam expressão fracamente positivo, 21,4% expressão positiva e 28,6% fortemente positivo, e apenas uma minoria de pacientes 16,7% apresentam expressão negativa de Cat S, onde o grupo câncer apresenta maior expressão de Cat S com resultados estatisticamente significativos ($p = 0,002$). A expressão de Cat S foi significativamente maior no câncer gástrico, quando comparados com a gastrite; houve um aumento moderado da expressão da Cat S nos casos de gastrite associados à infecção por *H. pylori* quando comparados à gastrites sem infecção; não houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão da Cat S com as variáveis clínico-patológicas TNM do câncer gástrico.

Palavras-chave: câncer gástrico; catepsina S; *helicobacter pylori*; gastrite; biomarcador; histoquímica.

ABSTRACT

Gastric cancer is the fourth most common cancer and the second leading cause of cancer death in the world. Cathepsin S (Cat S) is a protein expressed in some epithelial cells, which is associated with local invasion, metastasis and cancer recurrence. The purpose To analyze and compare the expression of the biomarker cathepsin S between Gastritis and gastric cancer, through immunohistochemistry reaction. Cross-sectional study involving 92 patients, of which 42, with CG and 50 with gastritis. Gastritis patients were subdivided into two groups: positive or negative for H. pylori. CG patients were subdivided into two groups: early (stage I) and advanced (stage III). The biopsies of the CG patients were obtained through surgical resection, and the samples with gastritis through multiple biopsies by upper gastrointestinal endoscopy. The samples were sent for immunohistochemical staining study to evaluate the expression of Cat S. When comparing Cat S expression between gastric cancer and gastritis, it was observed that in gastritis, 38% have negative expression and 48% frankly positive expression, and only a minority of cases 14% show positive expression. In gastric cancer patients, 33.3% have weak positive expression, 21.4% positive expression and 28.6% strongly positive, and only a minority of 16.7% patients have negative expression of Cat S, where the cancer group shows higher expression of cathepsins S with statistically significant results ($p = 0.002$). **Conclusion:** Cat S expression was significantly higher in gastric cancer, when compared with gastritis; there was a moderate increase in Cat S expression in cases of gastritis associated with H. pylori infection when compared to gastritis without infection; there was no statistically significant correlation between the expression of cathepsin S with the clinical-pathological variables TNM of gastric cancer.

Keywords: gastric cancer; cathepsin S; helicobacter pylori; gastritis; biomarkers; immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Classificação da <i>American Joint Committee on Cancer</i> (AJCC)	18
Quadro 2 –	Estadiamento <i>American Joint Committee of Cancer</i>	19
Quadro 3 –	Biomarcadores envolvidos no câncer gástrico	21
Figura 1 –	Ação das catepsinas na degradação proteolítica de proteínas de adesão da matriz extracelular (ECM), tipo colágenos e elastina. Como também na clivagem de E-caderinas (moléculas de adesão célula-célula), tornando as células cancerosas livres.	23
Figura 2 –	Fotomicrografia de gastrite com reação de Imunohistoquímica com expressão negativa para catepsina S (aumento de 200X e 400X).	36
Figura 3 –	Fotomicrografias de gastrite com reação de Imunohistoquímica com expressão positiva para catepsina S, localizada principalmente no citoplasma das células (aumento de 200X e 400X).	36
Figura 4 –	Fotomicrografias de câncer gástrico com reação de Imunohistoquímica com expressão negativa para catepsina S (aumento de 200X e 400 X).	37
Figura 5 –	Fotomicrografia de câncer gástrico com reação de Imunohistoquímica com expressão positiva para catepsina S, localizada principalmente no citoplasma das células (aumento de 200X e 400 X).	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características clínicas e patológicas dos portadores de CG do estudo	35
Tabela 2 –	Características clínicas e de expressão da catepsina S dos pacientes envolvidos no estudo	40
Tabela 3 –	Correlação da expressão de catepsina S em gastrite	41
Tabela 4 –	Correlação da expressão de catepsina S por câncer gástrico	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i> ()
CATS	catepsina S
CG	câncer gástrico
ECM	matriz extracelular
EUA	Estados Unidos da América ()
G	Grau histológico
HC	Hospital das Clínicas
HER2	<i>Receptor tyrosine-protein kinase</i>
Hh	Hedgehog
IHC	coloração imuno-histoquímica
IMS	Instabilidade microssatélites
M	mestástase
MI	metaplasia intestinal
MUC1	mucina1
N	linfonodos
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	proteína tumoral53
PD-1	receptor de superfície celular morte programada-1
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
SAME	Serviço de Arquivo Médico Estatística
T	tumor
TAMs	macrófagos associados a tumores
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA	13
1.2	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	14
1.3	OBJETIVOS	15
1.3.1	Objetivo geral	15
1.3.2	Objetivos específicos	15
2	LITERATURA	16
2.1	CÂNCER GÁSTRICO	16
2.2	<i>HELICOBACTER PYLORI</i>	20
2.3	EXPRESSÃO DAS CATEPSINAS	22
3	MÉTODOS	27
3.1	POPULAÇÃO E LOCAL DE ESTUDO	27
3.2	DESENHO DE ESTUDO	27
3.3	CRITERIOS DE INCLUSÃO	27
3.4	CRITERIOS DE EXCLUSÃO	27
3.5	SELEÇÃO DA AMOSTRA	28
3.6	PROCEDIMENTOS	29
3.6.1	Procedimentos técnicos	29
3.6.2	Procedimentos cirúrgicos	29
3.6.3	Procedimentos imunohistoquímica	29
3.7	PROCEDIMENTOS DE COLETA DE DADOS	32
3.8	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	32
3.9	PROCEDIMENTOS ÉTICOS	32
4	RESULTADOS	33
4.1	COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA	33
4.2	CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS PACIENTES DE CG	33
4.3	INTERPRETAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CATEPSINA S EM GASTRITE E NO CÂNCER GÁSTRICO	36
4.4	RESULTADOS DA EXPRESSÃO DE CATEPSINA S EM PACIENTES COM GASTRITE E CÂNCER GÁSTRICO	38

4.5	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM GASTRITE E CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CATEPSINA S	41
4.6	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM CANCER GÁSTRIC E CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CATEPSINA S	42
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
	APÊNDICE A – VERSÃO DO ARTIGO ORIGINAL A SER PUBLICADO NA REVISTA GASTRIC CANCER, APÓS CORREÇÕES DA BANCA EXAMINADORA	57
	APÊNDICE B – REGISTRO DE CÂNCER GÁSTRICO DOS PACIENTES DO ESTUDO	72
	APÊNDICE C – REGISTRO DE BIÓPSIA ENDOSCÓPICAS DO PACIENTES DO ESTUDO	74
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM HUMANOS	75
	ANEXO B – VERSÃO DO ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO NA REVISTA MOLECULAR AND CLINICAL ONCOLOGY	76

1 INTRODUÇÃO♦

1.1 APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA

O câncer gástrico (CG) é um importante problema de saúde, sendo o quarto câncer mais comum e a segunda causa de morte por câncer no mundo. Em 2018, 1.033.701 casos novos de CG foram diagnosticados em todo mundo, incluindo 26.240 casos nos Estados Unidos, e 21.230 casos no Brasil. Muitos pacientes têm doença inoperável no diagnóstico ou doença recorrente após ressecção com intenção curativa, estimando-se que cerca de 782.685 pacientes morrem de câncer gástrico anualmente⁽¹⁻⁴⁾.

A sua incidência apresenta grande diversidade geográfica. Observa-se que mais de 50% dos novos incidentes ocorrem em países em desenvolvimento. As áreas com maior probabilidade de desenvolvimento de CG abrangem regiões como América Central e do Sul, Europa Oriental e Leste Asiático (China e Japão). As regiões de baixo risco incluem Austrália e Nova Zelândia, Sul da Ásia, Norte e Leste da África e América do Norte^(5,6). A mortalidade é consideravelmente alta em todas as partes do mundo, sendo a média da taxa de sobrevida em cinco anos de 21% na Europa e de 18% nos Estados Unidos da América (EUA), este último levando em consideração apenas pacientes brancos. A cidade de Osaka no Japão detém os melhores números, com uma taxa de sobrevida em 5 anos de 47%⁽²⁾.

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é o principal fator de risco para câncer de estômago esporádico, com quase 90% dos novos casos de câncer gástrico atribuídos a esta bactéria, e sendo descrita como um carcinógeno de classe I do desenvolvimento de CG pela Organização Mundial da Saúde desde 1994^(7,8). A infecção por *H. pylori* afeta mais da metade da população mundial, e aproximadamente 1% das pessoas infectadas desenvolvem um adenocarcinoma gástrico⁽⁹⁾. A maioria dos casos endêmicos de CG podem estar relacionada à infecção por *H. pylori*. De fato, o estudo Eurogast-EPIC descobriu que 93,2% dos pacientes com CG eram positivos para infecção por *H. pylori*, enquanto no Japão <1% dos pacientes com CG eram negativos para infecção por *H. pylori*⁽¹⁰⁻¹²⁾.

♦Tese formatada conforme orientação da Biblioteca Central e Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da UFPE: ABNT NBR 14724:2011. Versão do manuscrito a ser publicado na *Revista Gastric Cancer*, após correções da banca examinadora (APÊNDICE A).

O desenvolvimento de novas modalidades, tanto no diagnóstico, como no tratamento para paciente portadores de câncer gástrico, envolvendo o biomarcador catepsina S (Cat S), é de grande interesse para a comunidade médica, tendo em vista a alta incidência desse tipo de tumor, e ressaltando-se um papel importante da Cat S no crescimento e na progressão de tumores, destacando essa protease como um possível alvo para o tratamento desse tipo de câncer, assim como em gastrite por *H. pylori* por ser considerada uma etapa inicial na tumorigênese em pacientes que desenvolvem câncer de estômago. A correta identificação dos mecanismos de carcinogêneses e seleção dos pacientes que irão se beneficiar com esta terapia são um passo importante para o sucesso do tratamento.

1.2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Neste cenário, um estudo incluindo um grande número de casos de pacientes com gastrite com infecção de *H. pylori* e câncer gástrico, com metodologias adequadas para a detecção da superexpressão de Cat S, poderão fornecer importantes informações para a seleção mais criteriosa desses pacientes. Existe também, uma necessidade crescente de se identificar biomarcadores úteis para o diagnóstico precoce do câncer gástrico, e correlação da carcinogênese relacionada entre Cat S e infecção por *H. pylori*. Sendo assim, a Cat S constitui uma importante alvo terapêutico, além, de sua utilidade no diagnóstico precoce e prognóstico, como também podendo estar relacionada a carcinogênese tumoral .

Devido à literatura escassa acerca da relação entre Cat S e CG, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos futuros, com o objetivo de elucidar o real valor da Cat S, tanto como marcador diagnóstico e prognóstico quanto com o um alvo terapêutico eficaz, para, assim, darmos um grande avanço nos cuidados com os pacientes portadores de CG.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Analisar a expressão do biomarcador catepsina S com gastrite e câncer gástrico, através de reação de imunohistoquímica.

1.3.2 Objetivos específicos

- ♦ Correlacionar a expressão da catepsina S nas amostras de gastrite e câncer gástrico com infecção por *H. pylori*;
- ♦ Correlacionar a expressão de catepsina S com variáveis clínico-patológicas em amostras de tecido com câncer gástrico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER GÁSTRICO

O câncer gástrico é a segunda causa de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo, especialmente nos países do Leste Asiático, como Japão e China^(2,13). Pesquisadores apontam que a carcinogênese gástrica humana é um processo patológico lento, progressivo e multifatorial. O processo é composto de várias etapas de gastrite superficial crônica, gastrite atrófica, metaplasia intestinal (MI), displasia e adenocarcinoma⁽¹⁴⁾. Os estágios mais comuns na progressão para adenocarcinoma gástrico são atrofia gástrica e metaplasia intestinal gástrica, que são coletivamente conhecidas como gastrite atrófica crônica. Os fatores de risco comuns de câncer gástrico incluem infecção pela bactéria *H. pylori*, tabagismo, dietas ricas em sal, suscetibilidade à síndrome do câncer gástrico hereditário. A identificação do *H. pylori* como fator causal do câncer gástrico e a erradicação direcionada reduziram a incidência de câncer gástrico em todo o mundo nos últimos 50 anos. No entanto, outros fatores que incluem o aumento recente de dieta não saudável e obesidade também podem ter influência na incidência de câncer gástrico^(15,16).

A maioria dos cânceres gástricos são do tipo adenocarcinomas, e as classificações, mais usadas são os esquemas Lauren e WHO^(17,18). Os adenocarcinomas gástricos foram subdivididos por Lauren em dois subtipos: intestinal e difuso, e posteriormente, o tipo indeterminado foi incluído para caracterizar histologia infrequente. Os subtipos intestinais são mais comum em homens e em pacientes mais velhos, e estão associado à gastrites do corpo que levam a atrofia e metaplasia intestinal, displasia e posteriormente câncer. Os padrões das metástases são mais hematogênica e com disseminação para linfonodos e fígado. O subtipo difuso microscopicamente corresponde ao padrão de células em anel de sinete (células com presença de mucina intracelular em grande quantidade), e é mais frequente em pacientes mais jovens e em mulheres, e está mais relacionado a casos de pangastrite sem atrofia, e apresentam padrões de metástases para linfonodos e peritônio. Geralmente, são mais agressivos, oferecendo piores taxas de sobrevida global^(6,17).

A classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) emitida em 2010 é considerada a mais detalhada entre todos os sistemas de classificação. Pela classificação da OMS, o adenocarcinoma gástrico inclui múltiplos subgrupos, como

carcinoma tubular, mucinoso, papilar, mistos e pouco coesivos^(18,19). Os fenótipos histológicos não podem orientar as decisões terapêuticas. No entanto, a presença de células em anel de sinete na histologia e / ou o fenótipo difuso (ou pouco diferenciado) tem sido clinicamente associada com resistência à terapia e mau prognóstico⁽²⁰⁾.

O estadiamento para o câncer gástrico pode ser realizado no pré-operatório através de tomografias e endoscopia, porém o estadiamento completo é determinado pela análise anatomopatológica na peça cirúrgica, Conforme a classificação da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC)²¹.

Quadro 1 – Classificação da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC)

Tumor primário (T)	
Tx	Tumor primário não pode ser acessado T0: Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> . Tumor epitelial sem invasão da lâmina própria T1: Tumor invade lâmina própria, muscular da mucosa ou submucosa
T1a	Tumor invade lâmina própria ou muscular da mucosa
T1b	Tumor invade submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria
T3	Tumor penetra no tecido conjuntivo da subserosa sem invadir peritônio visceral ou estruturas adjacentes
T4	Tumor invade a serosa (peritônio visceral) ou estruturas adjacentes
T4a	Tumor invade a serosa (peritônio visceral)
T4b	Tumor invade estruturas adjacentes
Linfonodos regionais (N)	
Nx	Linfonodos regionais não podem ser acessados N0: Sem metástase para linfonodos regionais
N1	Metástases de 1 a 2 linfonodos regionais N2: Metástases em 3 a 6 linfonodos regionais
N3	Metástases em 7 ou mais linfonodos regionais N3a: Metástases em 7 a 15 linfonodos regionais
N3b	Metástases em 16 ou mais linfonodos regionais
Metástases a distância (M)	
M0	Sem metástase à distância
M1	Metástase à distância
Grau histológico (G)	
Gx	Grau histológico não pode ser determinado
G1	Bem diferenciado
G2	Moderadamente diferenciado
G3	Pobremente diferenciado
G4	Indiferenciado

Tumor Primário (T), à invasão de linfonodos regionais - N, e a presença ou não de metástases à distância - M, e grau histológico – G

Fonte: *American Joint Committee on Cancer*⁽²¹⁾, 2018.

O estadiamento, ainda de acordo com a *American Joint Committee of Cancer* (AJCC) é agrupado para compor o estadiamento TNM para carcinoma gástrico da seguinte forma⁽²¹⁾:

Quadro 2 – Estadiamento *American Joint Committee of Cancer*

Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio IA	T1	N0	M0
Estádio IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
Estádio IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
Estádio IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
Estádio IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
Estádio IIIB	T4b	N0, N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
Estádio IIIC	T4a	N3	M0
	T4b	N2, N3	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: American Joint Committee on Cancer⁽²¹⁾, 2018.

O tratamento cirúrgico é a única opção terapêutica curativa para o câncer gástrico, consistindo de forma geral na realização de mucosectomia, para pequenos tumores em estágio inicial bem diferenciados (T1a), gastrectomia subtotal para os tumores localizados nos dois terços inferiores do o estômago, ou gastrectomia total para cânceres gástricos com células em anel de sinete, e aqueles localizados no corpo e terço superior do estômago ou com gastrite atrófica, devendo-se ser associados a linfadenectomia D2 como forma de tratamento para as doenças localizadas, e uma

associação variável de modalidades de tratamento, incluindo cirurgia, radioterapia e quimioterapia neoadjuvantes ou adjuvantes nos casos de doença mais avançada^(12,22,23).

Pacientes que apresentam doença irresssecável e metastáticas recebem tratamentos sistêmicos, e o teste de tumor HER2 é recomendado para este grupo, já que a terapia direcionada a HER2 está disponível⁽²⁴⁾. Apesar das melhorias nas modalidades de tratamento do câncer gástrico, as taxas de sobrevida global em 5 anos permanecem insatisfatórias, em torno de 25–30%, com exceção no Japão e na Coreia do Sul, cuja as taxas são superiores a 50%^(12,25). Embora o estágio inicial T1 esteja associado a uma taxa de sobrevida de 5 anos em torno de 95%, o adenocarcinoma gástrico em estágio avançado (que não pode ser tratado cirurgicamente) tem uma sobrevida média de 9-10 meses⁽¹⁾.

2.2 *HELICOBACTER PYLORI* E BIOMARCADORES

Alguns pacientes com infecção persistente por *H. pylori* desenvolvem atrofia gástrica seguida por metaplasia intestinal, que pode evoluir para displasia e adenocarcinoma⁽²³⁾. A eficácia da erradicação do *H. pylori* para prevenção de lesões pré-cancerosas e do câncer gástrico foi comprovada em diferentes populações, e a erradicação foi recomendada pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer da OMS como estratégia de prevenção do CG⁽²⁶⁾. A classe econômica menos favorecida é um fator de risco para infecção por *H. pylori*, porque está associado a condições de vida mais aglomeradas que favorecem a transmissão intrafamiliar⁽²⁷⁾. O *H. pylori* está envolvido em diversos mecanismos de virulência para o desenvolvimento do câncer gástrico, como a Cag A, que interage com as células epiteliais gástricas para induzir inflamação crônica e múltiplas alterações na expressão gênica, além de alterações epigenéticas, levando a carcinogênese gástrica⁽²⁸⁾.

Embora muitos oncogenes, genes supressores tumorais e a infecção por *H. pylori* tenham sido implicados no desenvolvimento do câncer gástrico, os mecanismos moleculares subjacentes relacionados a progressão e metástase, ainda permanecem precariamente entendidos. A malignidade do câncer não depende apenas de seu genótipo, mas também nas complexas interações entre as células tumorais e outros tipos de células presentes no microambiente tumoral. Essa comunicação célula-célula é amplamente alcançada por meio de um vasto espectro de substâncias secretadas,

incluindo as proteínas, que são essenciais para os processos de diferenciação, invasão, metástase e angiogênese dos cânceres⁽²⁹⁻³¹⁾.

Alguns biomarcadores moleculares foram amplamente estudados no câncer gástrico, e apresentaram importância significativa no prognóstico e no direcionamento do tratamento da doença. Os principais descritos no quadro 1, onde incluí-se também as catepsinas como possível biomarcador.

Quadro 3 – Biomarcadores envolvidos no câncer gástrico.

Biomarcador	Impacto no câncer gástrico
HER 2	A superexpressão / amplificação de HER2 está presente 7% a 34% no câncer gástrico, mais comum nos tumores proximais e no tipo histológico intestinal. Sobrevida global mediana mais longa em pacientes com câncer gástrico HER2 positivo em comparação com aqueles com tumores HER2-negativos. Direcionar a terapia com trastuzumabe para câncer gástrico metastático ⁽³²⁻³⁴⁾ .
TP53	A mutação TP53 é identificada mais frequentemente no tipo intestinal, e apresenta um desfecho mais curto em pacientes com GC. Mutações no gene p53 ocorrem nos estágios iniciais do carcinoma gástrico e sua frequência aumenta em estágios avançados ^(35,36) .
PD1	A expressão de PD-L1 varia em 15% a 70% dos casos de CG, e estão correlacionados com resultados ruins ⁽³⁷⁾ .
MUC	A alta expressão de proteínas mucinas, como MUC1, MUC2, MUC5AC e MUC6, está associada ao processo de carcinogênese gástrica. A expressão de MUC1 pode ser considerada um fator prognóstico em pacientes com câncer gástrico avançado ^(38,39) .
MSI	Instabilidade microssatélites (IMS), ocorre em 20% de todos os pacientes com CG. Pacientes com IMS-alto apresentam melhor prognóstico ⁽⁴⁰⁾ .
Catepsinas	Os níveis séricos de Cat S aumentam significativamente nos portadores de CG. Promove fenótipos altamente invasivos e está associado a mau prognóstico ⁽⁴¹⁾ .

HER2 = receptor de superfície celular do tipo tirosina quinase, proteína tumoral53 = p53, receptor de superfície celular morte programada-1 = PD-1 e seu ligante = PDL1, MUC= mucina, IMS= instabilidade de microssatélites.

2.3 EXPRESSÃO DAS CATEPSINAS

As catepsinas são enzimas lisossomais pertencentes à família da papaína, e compreendem uma família de 15 proteases lisossomais (A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, O, S, V, W e X), amplamente distribuídas nos espaços intracelulares e extracelulares, das quais 5 foram repetidamente implicadas na progressão de cânceres sólidos (catepsinas B, H, K, L e S)^(42,43).

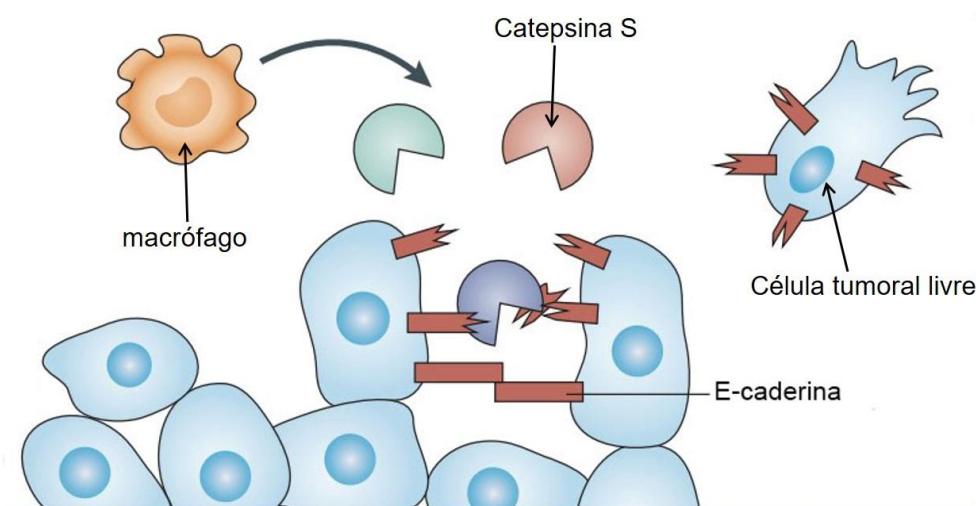
Essas proteases participam em várias atividades patológicas, e sua expressão é desregulada em uma ampla variedade de tumores, sendo sua superexpressão geralmente associada a fenótipos tumorais altamente agressivos. O aumento da atividade e a localização aberrante de proteases no microambiente tumoral têm um papel potente na progressão, proliferação, invasão e metástase. Um amplo dados de pesquisas comprovam seu envolvimento na progressão do câncer, angiogênese, metástase e na ocorrência de resistência a drogas⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾.

As catepsinas modificam o microambiente tumoral por meio da degradação da matriz extracelular, como também liberam moléculas de adesão célula-célula, sendo os macrófagos associados a tumores (TAMs), a principal fonte de catepsina nos tumores^(43,47). As catepsinas favorecem para a invasão de tecidos e metástases. Portanto, representam uma importante classe de proteínas que facilitam a progressão e disseminação do câncer^(44,48-50). Pesquisadores sugerem que as catepsinas, particularmente as catepsinas B, D, E, L e S, contribuem para a tumorigênese digestiva. Descobriu-se que as catepsinas promovem o desenvolvimento da maioria dos cânceres digestivos, exceto o câncer de fígado, no qual podem ter efeitos opostos^(45,51).

As catepsinas contribuem em pelo menos três estágios do câncer. Primeiro, uma das principais características das células cancerosas é sua enorme capacidade proliferativa, que requer a participação de várias citocinas, e as catepsinas podem processá-las em proteínas maduras para promover a divisão celular. Em segundo lugar, o crescimento das células cancerosas requer vasos sanguíneos para fornecer nutrientes. Nesse estágio, as catepsinas contribuem para a degradação da membrana basal vascular e ativam fatores de crescimento para promover a angiogênese. Além disso, quando secretadas na matriz pericelular, as catepsinas clivam a laminina, o colágeno tipo IV, a elastina, fibronectina, proteoglicanos, a caderina-E e outras

proteínas, degradando as junções entre as células e a matriz extracelular, e assim, permitindo que as células cancerosas causem invasão e metástases^(52,53) (Figura 1).

Fig. 1 – Ação das catepsinas na degradação proteolítica de proteínas de adesão da matriz extracelular (ECM), tipo colágenos e elastina. Como também na clivagem de E-caderinas (moléculas de adesão célula-célula), tornando as células cancerosas livres.



Fonte: Olson et al.⁽⁴⁴⁾, 2015

As catepsinas participam de uma ampla gama de atividades do organismo com base em seu efeito de hidrólise. Em cânceres digestivos, a expressão de catepsinas é regulada positivamente por fatores promotores de tumor, como C-myc, K-ras, AGR2, MAPK, p38 e as vias de sinalização de Hedgehog (Hh). Em células cancerosas digestivas, as catepsinas ativadas hidrolisam fatores de crescimento, como EGF, VEGF e TGF β , para induzir sua maturação e promover a proliferação de células cancerosas, e muitas evidências apoiam a hipótese de que as catepsinas podem estar envolvidos na regulação da apoptose^(45,54). Além disso, as catepsinas estão envolvidas na resposta à terapia anticâncer dentro do microambiente tumoral e podem ter papéis cruciais no desenvolvimento de fenômenos de resistência à terapêutica⁽⁴⁶⁾.

Para o diagnóstico do câncer gástrico, são utilizados meios invasivos como endoscopia e biópsia. Existem alguns marcadores tumorais que também podem auxiliar no diagnóstico e acompanhamento da doença, como CEA, CA 72-4 e CA19-9, porém apresentam o inconveniente de baixa sensibilidade e especificidade. O valor diagnóstico da Cat S sérica tem se mostrado interessante, com uma especificidade semelhante aos marcadores tradicionais (CEA, CA724 e CA19.9), porém com uma sensibilidade mais elevada. A associação da Cat S sérica com os marcadores

tradicionais citados parece ter melhores resultados, apresentando especificidade e sensibilidade de 91,2% e 72,6%, respectivamente^(41,51).

No momento, há uma necessidade crescente de se identificar biomarcadores úteis para o diagnóstico precoce não invasivo e monitoramento da progressão do câncer gástrico. A catepsina S tem sua expressão aumentada em diversos tipos de cânceres, incluindo o CG, e uma das suas principais fontes nos tumores são os macrófagos associados a tumores (TAMs). Sendo assim, a catepsina S pode se constituir não só como um alvo terapêutico, mas também como um marcador prognóstico da doença, estando inteiramente relacionada com a ocorrência de metástases^(55,56).

A expressão e a atividade das catepsinas são geralmente reguladas positivamente na inflamação crônica e nos cânceres. Consequentemente, eles são superexpressos em tumores, principalmente para Cat B e Cat S, incluindo no linfoma folicular, câncer gástrico, cólon, cérebro, mama e câncer pancreático^(57,58). O aumento da expressão da catepsina geralmente se correlaciona com o grau de agressividade e a mau prognóstico dos pacientes. A secreção de proteases da catepsina pelas células cancerosas no espaço extracelular interrompe os complexos de adesão intercelular, induz a angiogênese e impulsiona a invasão local pelas células tumorais. As proteases da catepsina têm demonstrado papéis na resistência intrínseca e adquirida à radioterapia e a quimioterapia. A inibição simultânea de catepsinas com diferentes modalidades terapêuticas melhora o resultado em modelos pré-clínicos⁽⁴⁴⁾. Devido às suas funções importantes nos tumores digestivos, as catepsinas podem ser alvos terapêuticos para o tratamento de cânceres digestivos^(59,60).

As catepsinas são superexpressas nas células cancerosas digestivas e, em particular, promovem a invasão do câncer e a metástase. A catepsina B, que está aumentando para cima-regulada durante a progressão do estágio do tumor (estágios T, N e TNM), está associada a um mau prognóstico em pacientes e um aumento no tamanho do tumor. Por exemplo, em células tumorais, as catepsinas se translocam para a superfície celular para degradar a ECM, permitindo a invasão ou metástase de células tumorais⁽⁶¹⁾.

Pesquisadores relataram a superexpressão de catepsina B em pacientes portadores de câncer gástrico em comparação a pacientes saudáveis, e associação com estádios mais avançados e taxa de sobrevivência reduzida da doença. A catepsina E também apresenta um alto nível de expressão no carcinoma gástrico,

mais acentuado nos carcinomas pouco diferenciados. A Cat E foi expressa positivamente em 100% dos carcinomas em anel de sinete, podendo ser um marcador útil para esse tipo específico de CG^(62,63). Em outro estudo semelhante, Konno-Shimizu et al., analisaram a expressão de catepsina E em câncer gástricos, e relataram a sua super expressão no carcinoma de células de anel de sinete do estômago. Observaram também, que nas análises de correlação a expressão de catepsina E está positivamente associada ao marcador gástrico MUC5AC ($p < 0,0001$), e negativamente associada ao marcador intestinal MUC2 ($p = 0,0019$), e concluíram que a catepsina E, como a MUC5AC, é um dos marcadores de diferenciação gástrica⁽⁶⁴⁾.

Krueger et al., estudaram a expressão de Cat X em tecido gástrico normal, gastrite infectada por *H. pylori* e no câncer gástrico. Eles observaram uma baixa expressão de Cat X no tecido gástrico normal, e um aumento na expressão na mucosa gástrica infectada por *H. pylori* e no câncer gástrico, porém mais intensa no câncer gástrico. Observaram também que, usando oligonucleotídeos antisense, a regulação positiva da catepsina X foi diretamente associada com maior invasividade *in vitro*⁽⁶⁵⁾.

Liu et al., avaliaram a dosagem sérica de catepsina S como um biomarcador no diagnóstico e prognóstico do câncer gástrico. Em seu estudo, avaliaram pacientes saudáveis, pacientes com doenças gástricas benignas e com câncer gástrico, e dosaram os níveis de Cat S por o ensaio imunoenzimático (ELISA). Eles observaram que os níveis séricos de Cat S aumentaram significativamente nos pacientes portadores de câncer gástrico. O valor diagnóstico de Cat S sérico apresentou uma sensibilidade de 60,7% e uma especificidade de 90,0%. Além disso, os níveis séricos de catepsina S teve correlação significativa com o tumor primário (T), disseminação linfonodal (N) e metástase a distância (M). Ressaltaram também, que os pacientes com níveis séricos elevados de catepsina S tiveram uma pior sobrevida global. Este estudo sugeriu que a catepsina S sérica pode ser um biomarcador importante para o diagnóstico e prognóstico de CG⁽⁴¹⁾.

Yang et al., quantificaram, através de espectrometria de massa, as proteínas secretadas por tecido gástrico normal e por células do câncer gástrico do tipo bem diferenciado e pouco diferenciado. Os níveis de expressão das proteínas encontrados foram significativamente diferente entre células normais e cancerosas. Um exame adicional validou a regulação positiva da expressão de catepsina S no câncer gástrico, e o silenciamento da expressão de CTSS suprimiu a migração e invasão de células

cancerosas gástricas *in vitro*. A análise proteômica demonstrou que a catepsina S medeia a migração e invasão de células cancerosas gástricas por meio de uma rede de proteínas associadas à metástase. O papel implicado da catepsina S na metástase do câncer gástrico fornece uma oportunidade para testar os compostos existentes contra o CTSS para terapia adjuvante e no tratamento de cânceres gástricos metastáticos⁽⁶⁶⁾.

A FOXO3a é um importante fator de transcrição envolvido em vários cânceres humanos. Yu et al., relataram que a superexpressão da FOXO3a promoveu migração e invasão de células cancerosas gástricas por regulação positiva da catepsina L. A FOXO3a aumentou a expressão da catepsina L, reprimindo a expressão da E-caderina, responsável pela adesão célula-célula, como também, através da regulação de proteínas envolvidas na degradação da matriz extracelular (ECM)⁽⁶⁷⁾. Os anticorpos inibitórios contra catepsina S testados em investigações pré-clínicas mostraram uma redução significativa do crescimento do tumor e melhoria da eficiência quimioterapêutica^(68,69). Além disso, os níveis séricos das catepsinas podem representar importantes marcadores diagnósticos e prognósticos^(43,70). As catepsinas demonstraram ser parte da resposta dinâmica à terapia anticâncer no microambiente tumoral e podem ter papéis cruciais no desenvolvimento da resistência terapêutica^(71,72).

3 MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO E LOCAL DE ESTUDO

Estudo transversal envolvendo 92 de pacientes com diagnóstico de câncer gástrico e gastrite, operados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, no período de 2017 a 2020. Os dados foram coletados de prontuários junto ao Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) desta instituição.

3.2 DESENHO DE ESTUDO

O tipo de estudo transversal e observacional.

3.3 CRITERIOS DE INCLUSÃO

Todos os pacientes incluídos no estudo obedecerem aos seguintes critérios de elegibilidade:

- Pacientes com câncer gástrico, com histologia positiva para adenocarcinoma de estômago;
- Portadores de gastrite, com exame de anatomia patológica confirmada.
- Pesquisa de *H. pylori* pelo teste de urease e confirmação histopatológica pela coloração de Giemsa.

3.4 CRITERIOS DE EXCLUSÃO

Para portadores de câncer gástrico, foram considerados inelegíveis para o estudo os pacientes:

- Sem indicação de ressecção cirúrgica;
- Com estadiamento TNM IV;
- Receberam tratamento neo-adjuvante;

Para portadores de gastrite, foram considerados inelegíveis para o estudo os pacientes:

- Submetidos a gastroplastia prévia;
- Que fizeram tratamento prévio para *H. pylori*.

3.5 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram coletadas para comparação 92 amostras de tecido gástrico. Foram estudados a expressão de catepsina S em 42 pacientes com câncer gástrico, e comparados a 50 pacientes com gastrite, dos quais foram subdivididos em 25 pacientes sem infecção de *H. pylori* e 25 pacientes com infecção por *H. pylori*. A pesquisa do *H. pylori* através do teste de urease e biópsia através de coloração de giemsa foi feito em todos os pacientes, incluindo os pacientes com câncer gástrico. Os participantes foram divididos de acordo com a presença ou ausência da infecção pelo *H. pylori*. As amostras foram estratificadas em dois grupos:

♦ **Grupo câncer gástrico:** 42 pacientes

- ✓ Estádio I = 20 pacientes
- ✓ Estádio III = 22 pacientes

♦ **Grupo gastrite:** 50 pacientes

- ✓ Gastrite com infecção por *H. pylori*: 25 pacientes
- ✓ Gastrite sem infecção por *H. pylori*: 25 pacientes

A amostras de gastrite do pacientes foram coletados através de múltiplas biópsias (seis) realizada por endoscopia digestiva alta, assim como do tecido gástrico de pacientes com câncer submetidos a gastrectomia. A confirmação anatomopatológica de câncer gástrico ou gastrite com e sem infecção por *H. pylori* foi feito através de lâminas de parafina, e a catepsina S foi detectada na mucosa gástrica por imunohistoquímica.

3.6 PROCEDIMENTOS

3.6.1 Procedimentos técnicos

As amostras dos blocos representativos do câncer gástrico selecionadas para este estudo foram resgatadas do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica da UFPE. Novos cortes histológicos foram obtidos e corados com hematoxilina-eosina (HE). Através do exame de microscopia óptica, as áreas representativas do tumor foram identificadas e marcadas. Foram feito então a marcação do bloco de parafina (bloco doador) na área escolhida, com caneta permanente. Utilizando o *tissue microarrayer* (Beecher Instrument, Silver Springe, MD, USA) foram extraídos os cilindros das áreas marcadas, e os mesmos transferidos para novos blocos de parafina (bloco receptor). Cada caso foi representado em duplicata, com a obtenção de dois cilindros de 1,0 mm cada, de duas áreas distintas e representativas do tumor. Cortes histológicos destes blocos foram obtidos e dispostos em lâminas adequadas para posterior realização dos estudos com Imunohistoquímica.

3.6.2 Procedimentos cirúrgicos

As biópsias dos portadores de câncer gástrico foram obtidas através de ressecção cirúrgica, e as amostras dos pacientes com gastrite com e sem infecção por *H. pylori* através de biópsias obtidas por endoscopia digestiva alta. A presença da infecção do *H. pylori* foi realizada pelo teste da urease e confirmada em biópsia por coloração de Giemsa. O grupo de pacientes sem infecção do *H. pylori*, tinham indicações clínicas para realização de endoscopia digestiva alta, como sintomas dispépticos ou doença do refluxo gastroesofágico.

3.6.3 Procedimentos imunohistoquímica

As reações de Imunohistoquímica foram realizadas utilizando-se o protocolo do Laboratório de Imunohistoquímica do Centro de Diagnóstico Anatomopatológico – (CEDAP). A coloração imunohistoquímica (IHC) foi realizada para estudar a expressão de catepsina S alterada da proteína em 42 tecidos de câncer gástrico humano e 50 de gastrite, utilizando o anticorpo policlonal, CTSS Rabbit pAb da marca Technology Abclonal®. A interpretação das reações imunohistoquímicas foram realizadas em microscópio óptico comum e foram analisadas a marcação, de acordo com o padrão específico para cada anticorpo

pesquisado. Foi utilizado um sistema de escore padronizado por Xu et al.⁽⁶¹⁾, considerando a intensidade da marcação e a quantidade de células marcadas.

A intensidade de marcação foi avaliada, utilizando-se a seguinte graduação⁽⁶¹⁾:

Graduação	Intensidade de marcação
0	sem coloração detectável
1	coloração fraca = amarelo claro
2	coloração moderada = amarelo marrom
3	coloração forte = marrom

A porcentagem de células tumorais coradas foi pontuado da seguinte forma⁽⁶¹⁾:

Pontuação	Porcentagem de células tumorais
0	nenhuma célula tumoral positiva
1	1-25% de células tumorais positivas
2	26-50% células tumorais positivas
3	51-75% de células tumorais positivas
4	> 75% de células tumorais positivas

A pontuação de coloração foi calculada como o produto da proporção de células tumorais positivas e a pontuação de intensidade de coloração. A expressão nível de catepsina S foi definido como segue⁽⁶¹⁾:

Expressão nível de catepsina S	Pontuação da coloração
-	pontuação 0, negativo
+	pontuação 1-4, fracamente positivo
++	pontuação 5-8, positiva
+++	pontuação 9-12, fortemente positivo

O valor de corte ideal foi estimado da seguinte forma: uma pontuação de índice de coloração ≥ 4 foi usado para definir tumores com alta expressão de catepsina S, < 4 indicando baixa expressão de catepsina S, e 0, ausência de expressão⁽⁶¹⁾.

◆ Técnica de Imunohistoquímica

- ✓ Desparafinização e hidratação dos cortes histológicos: 3 banhos em Xilol (5 minutos cada), 4 banhos de álcool, lavagem por 5 minutos em água corrente
- ✓ Recuperação antigênica na Pascal (câmara de pressão) em solução de citrato pH 6,0 à 125° C (30 segundos após atingir 125°C e pressão entre 20 e 25 psi). Lavagem em água corrente por 5 m
- ✓ Bloqueio da peroxidase endógena: 3 banhos de 5 minutos cada com Peróxido de Hidrogênio 10 volumes
- ✓ Lavagem em PBS
- ✓ Bloqueio de proteínas: 20 minutos com Bloqueador de Proteínas (DAKO)
- ✓ Incubação dos anticorpos primários, anti catepsina S, por 2 horas à temperatura ambiente em câmara úmida
- ✓ Lavagem em PBS
- ✓ Incubação com anticorpo secundário (Advance HRP Link - DAKO) por 30 minutos (Ta)
- ✓ Lavagem em PBS
- ✓ Incubação com polímero (Advance HRP enzyme - DAKO) por 30 minutos (Ta);
- ✓ Lavagem em PBS
- ✓ Revelação da reação com cromógeno diaminobenzidina (DAB) 5 minutos (Kit Liquid DAB+ Substrate Chromogen System; DakoCytomation, Carpinteria, California)
- ✓ Lavagem em água corrente
- ✓ Contra coloração com Hematoxilina de Harris por 2 minutos; 15- Lavagem em água corrente por 5 minutos
- ✓ Desidratação em álcool, Xilol, montagem em meio permanente

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Imunohistoquímica do Centro de Diagnóstico Anatomopatológico – (CEDAP), por um único patologista com experiência em tumores (Dr. Alexandre Rolim), e as lâminas foram revisadas para confirmação do diagnóstico anatomopatológico.

3.7 PROCEDIMENTOS DE COLETA DE DADOS

A coleta de dados para os pacientes portadores de câncer gástrico foi feita através de pesquisa com prontuários no Serviço de Arquivo Médico Estatística (SAME) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, e os dados foram coletados através do preenchimento do questionário específico desenvolvido para este estudo (APÊNDICES B e C).

3.8 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Para as análises estatística foram utilizados os Softwares STATA/SE 12.0 e o Excel 2010; Valores médios e desvios padrão foram calculados para descrever a população de dados. Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança, e um valor $p < 0,05$ foi considerado significativo em todos os testes. Os resultados estão apresentados em forma de tabela com suas respectivas frequências absoluta e relativa; a existência de associação foi verificada usando o teste Qui-Quadrado e o teste Exato de Fisher para as variáveis categóricas. O poder estatístico desta amostra foi de 72,7 % baseado no Odds ratio de 3,07, de acordo com a presença ou ausência de catepsina S nos grupos de câncer gástrico comparados com lesões benignas do estômago.

3.9 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

A realização da presente pesquisa obedeceu aos preceitos éticos da Resolução 466/12 ou 510/16 do Conselho Nacional de Saúde. Este estudo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco CAAE: 38000620.9.000.8807, parecer nº 4.491.158, uma vez que envolve seres humanos (ANEXO A).

Os pesquisadores assumiram também o compromisso ético com a publicação dos resultados deste estudo em artigos nacionais ou internacionais, e que poderam ser apresentado em congressos ou fóruns científicos.

4 RESULTADOS

4.1 COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA

Foram selecionados 92 pacientes, dos quais 50 pacientes apresentavam doenças benignas do estômago, no qual foi obtido biópsias através de Endoscopia digestiva alta, e 42 pacientes portadores de câncer gástrico submetidos à gastrectomia no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2020, sendo a pesquisa realizada pelo Departamento de Cirurgia abdominal da Universidade Federal de Pernambuco.

Noventa e dois pacientes foram estudados, dos quais 50 pacientes apresentavam gastrite e 42 pacientes apresentavam câncer gástrico. Nos pacientes portadores de gastrite, a idade variou de 18 a 78 anos, com mediana de 39,5 anos de idade. Dentre eles, 35 pacientes (70%) tinham menos que 50 anos, sendo 17 pacientes (34%) do sexo masculino e 33 pacientes (66%) do sexo feminino. Nos pacientes portadores de CG, a idade variou de 37 a 85 anos, com mediana de 62,5 anos. Dentre eles, 34 pacientes (81%) tinham mais que 50 anos, sendo 21 pacientes (50%) do sexo masculino e 21 pacientes (50%) do feminino.

4.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS PACIENTES DE CG

Foram analisadas as informações referentes a topografia da lesão, tipo de cirurgia, estadiamento TNM, tipo histológico, embolização vascular linfática, recidiva e estado atual dos pacientes.

Em relação a topografia do tumor, 23 pacientes apresentavam tumores nos antro (54,8%) e 19, no corpo gástrico (45,2%). A gastrectomia subtotal foi realizada em 20 pacientes (47,6%), e a gastrectomia total, em 22 pacientes (52,4%). Quanto ao estadiamento patológico, 10 pacientes foram classificados como estágio I A (23,8%), 10 como estágio IB (23,8%), 19 como estágio IIIB (45,3%), e 3 pacientes como estágio IIIC (7,1%). Em relação ao grau histológico, 18 tumores foram classificados como intestinal (42,9%), 18 como difuso (42,9%), e 6 como tumores mistos (14,2%). Detectou-se embolização vascular linfática de células neoplásicas em 23 casos (54,8,7%), estando ausente em 19 casos (45,2%). Ocorreram recidiva em 23,8% dos

casos. A situação desses pacientes no final do estudo foi: vivo sem doença (71.4%), vivo com doença (7,1%), óbito por outras causas (4,8%), óbito por câncer (16,7%). A Tabela 1 mostra as frequências das variáveis clínicas, estadiamento, terapêuticas e seguimento, entre os 40 pacientes com CG deste estudo.

Tabela 1 – Características clínicas e patológicas dos portadores de CG do estudo.

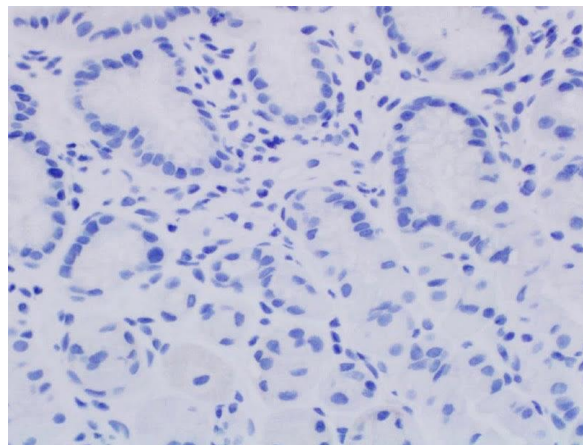
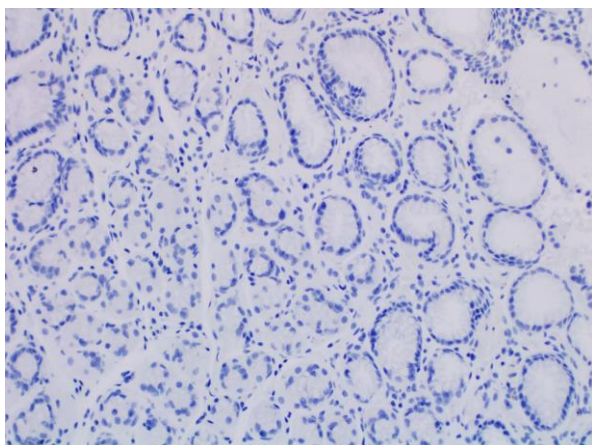
Variáveis	Grupo câncer gástrico	
	n	%
Topografia		
Antro	23	54,8
Corpo	19	45,2
Tipo de cirurgia		
Gastrectomia subtotal	20	47,6
Gastrectomia total	22	52,4
Estágio patológico		
IA	10	23,8
IB	10	23,8
IIIB	19	45,3
IIIC	03	7,1
Tumor primário		
T1	10	23,8
T2	10	23,8
T3	19	45,3
T4	03	7,1
Linfonodos		
N0	20	47,6
N3	22	52,4
Tipo histológico		
Intestinal	18	42,9
Difuso	18	42,9
Misto	06	14,2
Grau histológico		
Bem diferenciado	03	7,1
Moderadamente	08	19,0
Pouco diferenciado	31	73,9
Invasão angiolinfática		
Positivo	23	54,8
Negativo	19	45,2
Recidiva		
Sem recidiva	32	76,2
Com recidiva	10	23,8
Status atual		
Vivo sem doença	30	71,4
Vivo com doença	03	7,1
Óbito sem câncer	02	4,8
Óbito com câncer	07	16,7
Óbito		
Sim	09	21,4
Não	33	48,6

Fonte: autor

4.3 INTERPRETAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CATEPSINA S EM LESÕES GÁSTRICAS BENIGNAS E NO CÂNCER GÁSTRICO

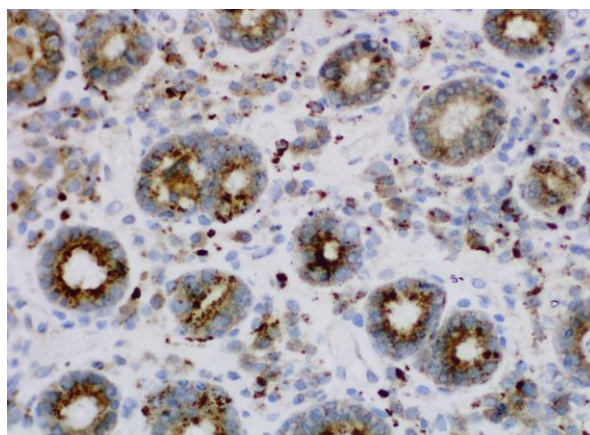
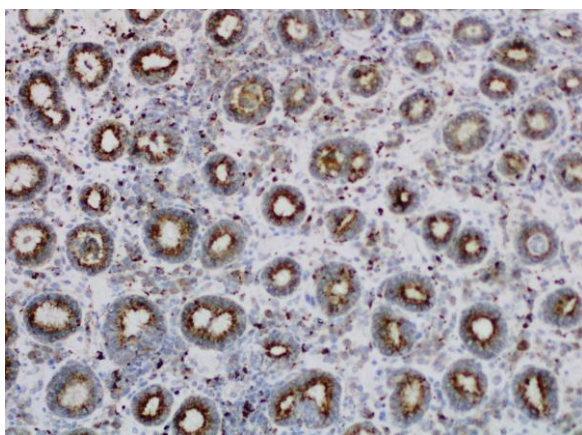
As figuras abaixo mostram reações de imuno-histoquímicas com expressão positiva e negativa de catepsinas S em gastrite e em câncer gástrico.

Fig. 2 – Fotomicrografia de gastrite com reação de Imunohistoquímica com expressão negativa para catepsina S (aumento de 200X e 400X).



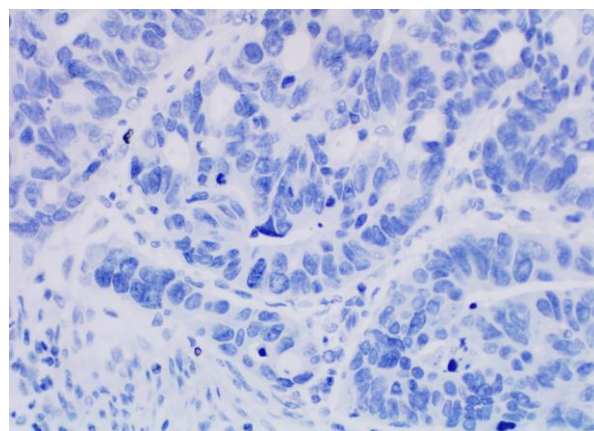
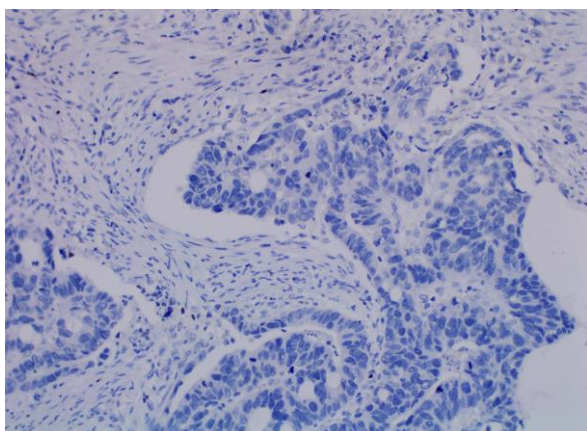
Fonte: autor

Fig. 3 – Fotomicrografias de gastrite com reação de Imunohistoquímica com expressão positiva para catepsina S, localizada principalmente no citoplasma das células (aumento de 200X e 400X).



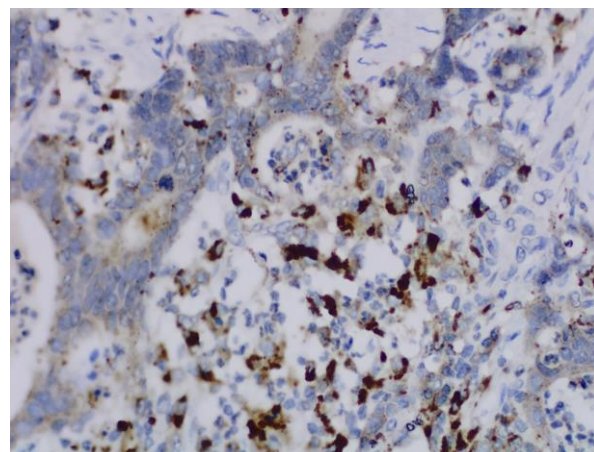
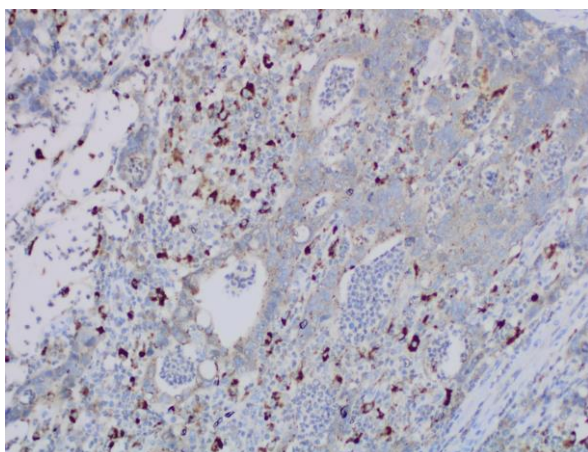
Fonte: autor

Fig. 4 – Fotomicrografias de câncer gástrico com reação de Imunohistoquímica com expressão negativa para catepsina S (aumento de 200X e 400 X).



Fonte: autor

Fig. 5 – Fotomicrografia de câncer gástrico com reação de Imunohistoquímica com expressão positiva para catepsina S, localizada principalmente no citoplasma das células (aumento de 200X e 400 X).



Fonte: autor

4.4 RESULTADOS DA EXPRESSÃO DE CATEPSINA S EM PACIENTES COM GASTRITE E CÂNCER GÁSTRICO

Foram realizadas análises de reação imunohistoquímica em 92 pacientes, do qual 50 pacientes apresentavam gastrite, e 42 pacientes com câncer gástrico. Quando comparamos pacientes com câncer gástrico e gastrite, podemos ver na tabela 2 do nosso trabalho, que a maioria dos pacientes com câncer de estômago tinha mais de 50 anos de idade, e a maioria dos pacientes de gastrite tinha idade menos que 50 anos ($p < 0,001$). Em relação à infecção por *H. pylori*, a maioria dos pacientes com câncer gástrico eram *H. pylori* negativo, enquanto os pacientes com gastrite apresentavam frequências semelhantes entre negativos e positivos para infecção por *H. pylori* ($p 0,004$).

Quando comparamos a porcentagem da expressão de catepsinas S entre câncer gástrico e gastrite, podemos observar que nas gastrite 38% não expressam catepsinas S, e 46% apresentam baixa expressão entre 1-25%, e apenas uma menor parte dos pacientes, 16% dos casos, que apresentam expressão maior que 25%. Contudo, podemos observar que nos pacientes com câncer, 19% apresentam expressão entre 25-50%, 14,3 % entre 51-75%, e 26,2% apresentam expressão maior que 75%, e apenas uma minoria dos pacientes, 16,7% dos casos, não expressam a catepsinas S, com resultados estatisticamente significativos ($p < 0,001$), através destes resultados podemos observar ausência de expressão ou baixa expressão de catepsina S em lesões benignas e alta expressão em câncer gástrico.

Quando comparamos a pontuação da expressão de catepsinas S entre câncer gástrico e gastrite, podemos observar que nas gastrite, 38% apresentam expressão negativa e 48% expressão francamente positiva, enquanto apenas uma minoria dos casos 14% apresentam expressão positiva ou fortemente positiva. Contudo, nos pacientes com câncer, 33,3 % apresentam expressão fracamente positivo, 21,4% expressão positivo e 28,6% fortemente positivo, e apenas uma minoria de pacientes 16,7% apresentam expressão negativa de catepsinas S, onde podemos observar, notavelmente, uma diferença de expressão de catepsinas S em gastrite e no câncer, onde o grupo câncer apresenta maior expressão de catepsinas S com resultados estatisticamente significativos ($p 0,002$).

No que se refere ao tipo de expressão, podemos observar que, nos pacientes com câncer, 50% dos casos apresentam alta expressão de catepsina S, e 16% ,

ausência de expressão, enquanto nos pacientes portadores de lesão benigna, apenas 14% apresentam alta expressão, 48% apresentam baixa expressão e 38%, ausência de expressão, com resultados estatisticamente significativos ($p = 0,001$), onde podemos concluir que existe diferença de expressão entre o grupo de lesão benigna e câncer, no qual o grupo câncer apresenta maior positividade e maior expressão de catepsina S.

A associação da expressão da catepsina S e características clínico-patológicas entre pacientes com gastrite e câncer gástrico está resumida na tabela 2.

Tabela 2 – Características clínicas e de expressão da catepsina S dos pacientes envolvidos no estudo

Variáveis	Grupos				p-valor*
	Câncer gástrico		Gastrite		
	n	%	n	%	
Idade					
Abaixo de 50 anos	8	19,0	35	70,0	<0,001
Acima de 50 anos	34	81,0	15	30,0	
Sexo					
Masculino	21	50,0	17	34,0	0,121
Feminino	21	50,0	33	66,0	
H. pylori com Giemsa					
Positivo	8	19,0	24	48,0	0,004
Negativo	34	81,0	26	52,0	
Intensidade de marcação de Catepsina S					
Sem coloração detectável	7	16,7	19	38,0	0,065
Coloração fraca=amarelo claro	9	21,4	13	26,0	
Colocração moderada=amarelo marrom	9	21,4	5	10,0	
Coloração forte=marrom	17	40,5	13	26,0	
Porcentagem de expressão de Catepsina S					
Sem células positivas	07	16,7	19	38,0	<0,001
1-25%	10	23,8	23	46,0	
25-50%	08	19,0	04	8,0	
51-75%	06	14,3	02	4,0	
>75%	11	26,2	02	4,0	
Pontuação de coloração de Catepsina S					
Negativo (0)	7	16,7	19	38,0	0,002
Fragamente positiva (1-4)	14	33,3	24	48,0	
Positivo (5-8)	09	21,4	03	6,0	
Fortemente positivo (9-12)	12	28,6	04	8,0	
Coloração de Catepsina S					
Positivo	35	83,3	31	62,0	0,024
Negativo	07	16,7	19	38,0	
Tipo de expressão					
Ausência – 0	7	16,7	19	38,0	0,001
Baixa < 4	14	33,3	24	48,0	
Alta ≥ 4	21	50,0	07	14,0	

(*) Qui-Quadrado (**)

Fonte: autor

Observe-se, na tabela 2, que houve diferença estatisticamente significativa na variáveis “idade”, “*H. pylori* com Giemsa”, “porcentagem de expressão de catepsina S”, “pontuação de coloração de catepsina S” e “tipo de expressão” em relação aos grupos analisados.

4.5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM LESÕES GÁSTRICAS BENIGNAS E CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CATEPSINA S

Foram analisadas a expressão de catepsina S em gastrite e correlacionadas com características clínicas patológicas. Quando comparamos a positivada da expressão de catepsinas S em gastrite, podemos observar que existiu uma associação entre pacientes com *H. pylori* positivo e expressão positiva de catepsina S, e associação do grupo de *H. pylori* negativo e expressão negativa de catepsinas S, com resultados estatisticamente significativos ($p < 0,001$), e podemos concluir que a infecção de *H. pylori* aumenta a expressão de catepsina S.

Tabela 3 – Correlação da expressão de catepsina S em gastrite

Variáveis	Pontuação de coloração de Catepsina S				p-valor*
	Positivo		Negativo		
	n	%	n	%	
Idade					
Abaixo de 50 anos	22	62,9	13	37,1	0,849
Acima de 50 anos	09	60,0	06	40,0	
Sexo					
Masculino	11	64,7	06	35,3	0,777
Feminino	20	60,6	13	39,4	
<i>H. pylori</i> urease					
Positivo	21	87,5	03	12,5	<0,001
Negativo	10	38,5	16	61,5	
<i>H. pylori</i> com Giemsa					
Positivo	21	87,5	03	12,5	<0,001
Negativo	10	38,5	16	61,5	

(*) Teste Qui-Quadrado

Fonte: autor

Na tabela 3 houve associação estatisticamente significativa nas variáveis “urease” e “*H. pylori*” em relação a “Pontuação de coloração de catepsina S”.

4.6 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM CANCER GÁSTRICO E CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CATEPSINA S

Foram analisadas a expressão de catepsina S em câncer e correlacionadas com características clínicas patológicas, mas não houve associação estatisticamente significativa como pode ser visto na tabela 4. Contudo, esse não era o objetivo principal deste estudo, e o tamanho da amostra dos pacientes com câncer era pequena, apenas 40 pacientes, sendo necessários novos estudos com amostragem maior, porém o estudo atual serve como base para futuros trabalhos neste tema.

Tabela 4 – Correlação da expressão de catepsina S por câncer gástrico

Variáveis	Pontuação de coloração de Catepsina S				p-valor*
	Positivo		Negativo		
	n	%	n	%	
Idade					
Abaixo de 50 anos	7	87,5	01	12,5	1,000
Acima de 50 anos	28	82,4	06	17,6	
Sexo					
Masculino	17	81,0	04	19,0	1,000
Feminino	18	85,7	03	14,3	
H. pylori com Giemsa					
Positivo	27	79,4	7	20,6	0,312
Negativo	08	100,0	0	0,0	
Topografia					
Antro	18	78,3	05	21,7	0,428
Corpo	17	89,5	02	10,5	
Tipo de cirurgia					
Gastrectomia subtotal	15	75,0	05	25,0	0,229
Gastrectomia total	20	90,9	02	9,1	
Estágio patológico					
IA	08	80,0	02	20,0	0,490
IB	07	70,0	03	30,0	
IIIB	17	89,5	02	10,5	
IIIC	03	100,0	0,0	0,0	
Tumor primário					
T1	08	80,0	02	20,0	0,490
T2	07	70,0	03	30,0	
T3	17	89,5	02	10,5	
T4	03	100,0	0,0	0,0	
Linfonodos					
N0	15	75,0	05	25,0	0,229
N3	20	90,0	02	9,1	
Tipo histológico					
Intestinal	14	77,8	04	22,2	0,852
Difuso	16	88,9	02	11,1	
Misto	05	83,3	01	16,7	
Grau histológico					
Bem diferenciado	03	100,0	0	0,0	0,177
Moderadamente	05	62,5	03	37,5	
Pouco diferenciado	27	87,1	04	12,9	
Invasão angiolinfática					
Positivo	20	87,0	03	13,0	0,682
Negativo	15	78,9	04	21,1	
Recidiva					
Sem ricidiva	26	81,3	06	18,8	1,000
Recidiva	09	90,0	01	10,0	
Status atual					
Vivo sem doença	24	80,0	06	20,0	0,475
Vivo com doença	02	66,7	01	33,3	
Óbito sem câncer	02	100,0	0	0,0	
Óbito com câncer	07	100,0	0	0,0	
Óbito					
Sim	09	100,0	0	0,0	0,314
Não	26	78,8	07	21,2	

(*) Teste Exato de Fisher

Fonte: autor

Não houve associação estatisticamente significativa na tabela 4.

5 DISCUSSÃO

Apesar da incidência do câncer gástrico ter diminuído nas últimas décadas, continua a ser o quarto câncer mais comum e a segunda maior causa de câncer associado à mortalidade em todo o mundo com uma estimativa de 1.033.701 novos casos e 782.685 mortes ocorridas em 2018^(2,3).

Nos últimos anos, foram relatados vários biomarcadores prognósticos e terapêuticos para câncer gástrico, no entanto, a maioria desses biomarcadores não são usados rotineiramente na prática clínica porque eles não podem prever o resultado clínico ou eficácia terapêutica com precisão e eficácia. Dessa forma, novos biomarcadores tumorais são, portanto, necessários para melhorar a detecção precoce, o diagnóstico e o prognóstico do câncer gástrico⁽⁶¹⁾.

A expressão e a atividade das catepsinas são geralmente reguladas positivamente na inflamação crônica e nos cânceres. Consequentemente, eles são superexpressos em tumores, principalmente para Cat S e Cat B, incluindo no linfoma folicular, câncer gástrico, cólon, cérebro, mama e câncer pancreático^(57,58). Alguns estudos têm mostrado que o aumento da expressão das catepsinas é correlacionado com cânceres invasivos e metastáticos, incluindo gliomas, câncer de mama, tumores de pulmão melanomas, câncer de pâncreas, câncer colorretal e câncer de próstata^(66,73-78). Comparando esses relatos com nosso estudo, podemos sugerir que a catepsina S apresenta papel importante na etiologia e patogenia do câncer gástrico e com sua correlação no mecanismo de carcinogênese pela infecção pelo *H. pylori*.

Xu et al., estudaram a expressão de Cat B comparando tecido gástrico normal e tumoral, e observaram que a expressão de Cat B foi maior no carcinoma gástrico do que nos tecidos normais. Em seus estudos, eles observaram que a alta expressão de Cat B foi detectada em 49,06% dos pacientes com CG quando comparados à lesão benigna⁽⁶¹⁾. No presente estudo, se observou resultados semelhante, onde a expressão de Cat S foi maior no carcinoma gástrico do que nos tecidos normais, e observamos que 50% dos pacientes portadores de CG apresentavam alta expressão de catepsina S, contudo 86% dos pacientes com gastrites apresentaram baixa e ausência de expressão de catepsina S. Eles descreveram em seu estudo que um alto nível de expressão da catepsina B diminuiu a expressão da lâmina extracelular favorecendo a invasão das células cancerosas gástricas e metástase,

sendo um fator de mau prognóstico. Ebert et al.⁽⁶²⁾, também, relataram a superexpressão de catepsina B em pacientes portadores de câncer gástrico em comparação a pacientes saudáveis, e associação com estágios mais avançados e taxa de sobrevivência reduzida da doença.

Atwa et al., observaram, que a catepsina E também apresenta um alto nível de expressão no carcinoma gástrico, mais acentuado nos carcinomas pouco diferenciados⁽⁶³⁾. A Cat E foi expressa positivamente em 100% dos carcinomas em anel de sinete, podendo ser um marcador útil para esse tipo específico de CG⁽⁶¹⁾. Em outro estudo semelhante, Konno-Shimizu et al., analisaram a expressão de catepsina E em câncer gástricos, e relataram uma super expressão no carcinoma de células de anel de sinete do estômago⁽⁶⁴⁾. No estudo atual não se evidenciou diferença da expressão de catepsina S nos diferentes tipos histológicos, contudo mais estudos com amostragem maior são necessários para validar esses resultados.

Krueger et al., recentemente identificaram o aumento da expressão da catepsina X na mucosa gástrica infectada por *H. pylori*. Pacientes com gastrite por *H. pylori* apresentaram expressão de catepsina X significativamente maior (2,5 vezes) do que pacientes *H. pylori* negativos. A catepsina X também foi regulada positivamente no câncer gástrico (3–12 vezes) em comparação com a mucosa não neoplásica. A catepsina X foi predominantemente expressa por macrófagos no estroma da mucosa e nas glândulas da mucosa antral. As células tumorais foram coradas para catepsina X em 68% pacientes com carcinoma gástrico, e a coloração foi significativamente mais comum e mais intensa no câncer gástrico quando comparado a mucosa não neoplásica⁽⁶⁵⁾. No estudo atual, encontrou-se resultados semelhantes, pois observamos um aumento da expressão de catepsina S na mucosa gástrica infectada por *H. pylori* em comparação com a mucosa não infectada. Observamos também uma regulação positiva para câncer gástrico (três vezes) em comparação a com a mucosa não neoplásica. As células tumorais foram coradas para catepsina S em 83% pacientes com carcinoma gástrico, e observamos também a coloração significativamente mais comum e mais intensa no câncer gástrico quando comparado a mucosa não neoplásica. Embora nenhuma correlação entre a expressão da catepsina S e o estágio TNM tenha sido encontrada, nosso estudo demonstra que a catepsina S desempenha um papel não apenas na inflamação crônica da mucosa gástrica, mas também na tumorigênese do câncer gástrico.

Liu et al., avaliaram a dosagem dos níveis séricos de Catepsina S, comparando seus níveis entre pacientes saudáveis, com doença gástrica benigna e portadores de câncer gástrico. Observaram que os valores séricos de Cat S dos pacientes com câncer gástrico foram significativamente maiores do que os dos controles de tecido gástrico não tumoral ($P < 0.001$). Além disso, ressaltaram também, que os níveis séricos de Cat S em pacientes com doenças gástricas benignas foram maiores do que nos pacientes saudáveis, mas menores do que os dos pacientes do GC⁽⁴¹⁾. Adicionalmente, observou-se neste estudo uma diminuição significativa nos níveis séricos de Cat S após a ressecção cirúrgica do tumor, no qual concluiu-se que as células gástricas tumorais superexpressam Cat S e, portanto, contribuíram para os níveis extremamente altos de Cat S circulante em pacientes com CG. No presente estudo observou-se resultados semelhantes na intensidade da coloração Imunohistoquímica, quando comparamos os grupos de gastrite e câncer gástrico, no qual observamos valores significativamente maiores da expressão de catepsina S em portadores de CG. O Resultado desses estudos sugere fortemente que a catepsina S pode ser um potencial biomarcador importante para o diagnóstico de GC.

Yang et al., estudaram a expressão das catepsinas em laboratório através quantificação proteicas em culturas de células normais e células de câncer gástrico. Os níveis de expressão das catepsina S e B encontrados foram significativamente diferentes entre células normais e cancerosas. Observou-se uma maior expressão proteica e uma regulação positiva da catepsina S e B, em contraste, as catepsinas L e B foram reguladas negativamente no secretoma do câncer gástrico neste estudo. Um experimento adicional através da coloração Imunohistoquímica foi realizado para estudar e validar a regulação positiva focado especificamente na catepsina S nas células cancerosas gástricas, um número significativo de tipos de câncer gástrico intestinal, difuso e misto expressou Catepsina S em níveis mais elevados do que os tecidos normais ($p < 0,01$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão de CTSS entre os subtipos de câncer gástrico. Os estudos de correlação da expressão de CTSS com outros parâmetros clínicos, como estadiamento clínico, sobrevida geral e livre de doença, também não produziram resultados significativos, sendo esses resultados insatisfatórios atribuídos ao pequeno tamanho da amostra usado neste estudo. Um tamanho de amostra maior seria necessário para esclarecer a associação da expressão do CTSS com os

parâmetros clínicos. Contudo, os dados foram suficientes para apoiar a noção de que o CTSS é relevante para a etiologia dos cânceres gástricos⁽²⁹⁾. Os resultados verificados neste trabalho, foram semelhantes encontrado pelos autores, tanto em termos dos níveis de expressão de catepsina S, que comparou a gastrite, quanto os correlacionados com o estadiamento TNM⁽²⁹⁾.

Pesquisadores demonstraram associações da Cat S com os tamanhos de tumor, estádios de linfonodais e metástases à distância nos pacientes GC; observando-se que estágios TNM mais avançados foram associados a níveis mais altos de Cat S. Observaram-se também que pacientes com alta expressão de Cat S exibiram uma sobrevida global inferior a pacientes com baixa expressão, sendo um fator prognóstico importante^(41,65). No presente estudo não se observou uma associação estatisticamente significativa da expressão de catepsina S com os estádios T, N e M. Contudo, esse não foi o objetivo principal e o tamanho da amostra de pacientes com câncer gástrico foi pequena, apenas 40 pacientes, não sendo possível avaliar de forma adequada essas variáveis.

Os resultados do presente estudo demonstraram claramente que o câncer gástrico exibiu maior expressão de catepsina S em comparação com tecidos gástricos não cancerosos. Portanto, consideramos que a catepsina S é um importante marcador molecular de carcinoma gástrico e pode ajudar tanto no diagnóstico, como em novas modalidades de tratamento. No entanto, no momento, os papéis precisos do CTS S em cânceres humanos ainda são desconhecidos, por existirem ainda poucos trabalhos na literatura correlacionando a expressão de catepsina S e câncer gástrico. Para entender as vias de sinalização precisas do catepsina S no carcinoma gástrico ainda necessitamos de mais estudos.

Neste estudo, constatou-se maior ausência da expressão de catepsina S na mucosa gástrica não infectada por *H. pylori*, e um aumento moderado da expressão nos casos de gastrite associados à infecção por *H. pylori* que apontam para uma função distinta desta bactéria no mecanismo de ação desta cisteína na mucosa gástrica cronicamente inflamada. Foi observado, também, que a maioria dos portadores de câncer gástrico não apresentam infecção por *H. pylori*, mesmo assim, apresenta uma alta expressão da catepsina S no câncer gástrico em comparação com o tecido não neoplásico. No qual pode-se concluir que a infecção por *H. pylori* e o câncer gástrico são fatores independentes que estão associados com aumento da expressão de catepsinas S. As limitações deste estudo incluíram seu desenho

transversal e observacional, período curto de seguimento e o número de paciente com câncer foi pequeno para avaliação da correlação da expressão da catepsina S com as variáveis clínicas do câncer, além de o estudo não ter tido financiamento.

Estes resultados reforçam a discussão a cerca do papel da CTTS na evolução do câncer gástrico, contudo, mais estudos ainda se fazem necessário objetivando de fato, a relação dessa enzima no processo na carcinogênese do adenocarcinoma gástrico e o real entendimento com a infecção pelo *H. pylori*.

6 CONCLUSÃO

Com nível de significância de 95%, concluí-se que:

- ◆ A expressão da catepsina S foi significativamente maior no câncer gástrico, quando comparados com o grupo de gastrite;
- ◆ Houve um aumento moderado da expressão da catepsinas S nos casos de gastrite associados à infecção *por H. pylori* quando comparados à gastrites sem infecção;
- ◆ Não houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão da catepsina S com as variáveis clínico-patológicas do câncer gástrico.

REFERÊNCIAS

1. AJANI, J. A. et al. Gastric Cancer, Version 3.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*, v.14, n.10, p.1286-1292, 2016.
2. BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, v.68, n.6, p.394-424, 2018.
3. SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*, v.68, n.1, p.7-30, 2018.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: *Incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2019.
5. ANG, T. L.; FOCK, K. M. Clinical epidemiology of gastric cancer. *Singapore Med J*, v.55, n.12, p.621-628, 2014.
6. MACHLOWSKA, J. et al. Gastric Cancer: Epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies. *Int J Mol Sci*, v.21, n.11, p.E4012, 2020.
7. PLUMMER, M. et al. Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer*, v.136, n.2, p.487-490, 2015.
8. ISHAQ, S.; NUNN, L. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: a state of the art review. *Gastr Hepatol Bed Bench*, v.8, suppl. 1, p.S6-S14, 2015.
9. HOOI, J. K. Y. et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*, v.153, n.2, p.420-429, 2017.
10. MATSUO, T. et al. Low prevalence of *Helicobacter pylori*-negative gastric cancer among Japanese. *Helicobacter*, v.16, n.6, p.415-419, 2011.
11. GONZALEZ, C. A. et al. *Helicobacter pylori* infection assessed by ELISA and by immunoblot and noncardia gastric cancer risk in a prospective study: the Eurgast-EPIC project. *Ann Oncol*, v.23, n.5, p.1320-1324, 2012.
12. AJANI, J. A. et al. Gastric adenocarcinoma. *Nat Rev Dis Primers*, v. 3, n.6, p.17036, 2017.
13. FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and method. *Int J Cancer*, v.144, n.8, p.1941-1953, 2019.

14. NAKAJIMA, N. et al. The expression of murine double minute 2 (MDM2) on *Helicobacter pylori*-infected intestinal metaplasia and gastric cancer. *J Clin Biochem Nutr*, v.44, n.2, p.196-202, 2009.
15. BANKS, M. et al. British Society of gastroenterology guidelines on the diagnosis and management of patients at risk of gastric adenocarcinoma. *Gut*, v.68, n.9, p.1545-1575, 2019.
16. YOON, H.; KIM, N. Diagnosis and management of high risk group for gastric câncer. *Gut Liver*, v.9, n.1, p.5-17, 2015.
17. LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histoclinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. v.64, n.1, p.31-49, 1965.
18. FLÉJOU, J. F. WHO Classification of digestive tumors: the fourth edition. *Ann Pathol*, v.31, suppl. 5, p.S27-31, 2011.
19. BOSMAN, F. T. et al. WHO *Classification of Tumours of the Digestive System* 4th ed. Geneva: WHO Press; 2010, p.48-58.
20. CHARALAMPAKIS, N. et al. The proportion of signet ring cell component in patients with localized gastric adenocarcinoma correlates with the degree of response to pre-operative chemoradiation. *Oncology*, v.90, n.5, p.239-247, 2016.
21. AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER (AJCC). *Cancer Staging Manual*. 8th ed. Germany: Springer; 2018.
22. MIN, Y. W. et al. Endoscopic treatment for early gastric cancer. *World J Gastroenterol*, v.20, n.16, p.4566-4573, 2014.
23. VAN CUTSEM, E. et al. Gastric cancer. *Lancet*, v.5, n.1, 2654-2664, 2016.
24. BARTLEY, A. N. et al. HER2 testing and clinical decision making in gastroesophageal adenocarcinoma: guideline from the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *Arch Pathol Lab Med*, v.140, n.12, p.1345-1363, 2016.
25. TORRE, L. A. et al. Global cancer incidence and mortality rates and trends-an update. *Can Epid Bio Prev*, v.25, n.1, p.16-27, 2016.
26. GUO Y, et al. Effect of *Helicobacter pylori* on gastrointestinal microbiota: a population-based study in Linq, a high-risk area of gastric cancer. *Gut*, v.69, n.9, p.1598-1607, 2020.
27. CROWE, S. E. *Helicobacter pylori* Infection. *N Engl J Med*, v.380, n.12, p.1158-1165, 2019.

28. WADHWA, R. et al. Gastric cancer-molecular and clinical dimensions. *Nat Rev Clin Oncol*, v.10, n.11, p.643-655, 2013.
29. YANG, Y. et al. Cathepsin S mediates gastric cancer cell migration and invasion via a putative network of metastasis-associated proteins. *J Proteome Res*, v.9, n.12, p.6801-6809, 2010.
30. SIQUEIRA, L. T. et al. A screening study of potential carcinogen biomarkers after surgical treatment of obesity. *Obes Surg*, v.3, n.1, p.1-7, 2018.
31. FUCHS, N. et al. Novel opportunities for Cathepsin S inhibitors in cancer immunotherapy by nanocarrier-mediated delivery. *Cell*, v.9, n.9, p.1-17, 2020.
32. BANG, Y. J. et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*, v.376, n.9742, p.687-697, 2010.
33. JANJIGIAN, Y. Y. et al. Prognosis of metastatic gastric and gastroesophageal junction cancer by HER2 status: a European and USA International collaborative analysis. *Ann Oncol*, v.23, n.10, p.2656-2662, 2012.
34. ELIMOVA, E. et al. Molecular biomarkers in gastric cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, v.13, n.4, p.e19-29, 2015.
35. BUSUTTIL, R. A. et al. Role of p53 in the progression of gastric cancer. *Oncotarget*, v.5, n.23, p.1216-1226, 2014.
36. MATSUOKA, T.; YASHIRO, M. Biomarkers of gastric cancer: Current topics and future perspective. *World J Gastroenterol*, v.24, n.26, p.2818-2832, 2018.
37. GU, L. et al. PD-L1 and gastric cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, v.12, n.8, p.e0182692, 2017.
38. LEE, H. S. et al. MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 expressions in gastric carcinomas: Their roles as prognostic indicators. *Cancer*, v.92, n.1, p.1427-1434, 2001.
39. KIM, K.; CHOI, K. W.; LEE, W. Y. Clinicopathologic correlation with MUC expression in advanced gastric cancer. *Korean J Clin Oncol*, v.14, n.2, p.89-94, 2018.
40. PINHEIRO, D. R. et al. Perspectives on new biomarkers in gastric cancer: diagnostic and prognostic applications. *World J Gastroenterol*, v.20, n.33, p.11574-11585, 2014.

41. LIU, W. L. et al. Evaluating the diagnostic and prognostic value of circulating cathepsin S in gastric cancer. *Oncotarget*, v.7, n.19, p.28124-28138, 2016.
42. TURK, V. et al. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta*, v.18, n.24, p.68-88, 2012.
43. WILKINSON, R. D. A. et al. Therapeutic, diagnostic, and prognostic potential. *Biol Chem*, v.396, n.8, p.867-882, 2015.
44. OLSON, O.; JOYCE, J. Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response. *Nat Rev Cancer*, v.15, n.12, p.712-729, 2015.
45. CHEN, S. et al. Cathepsins in digestive cancers. *Oncotarget*, v.8, n.25, p.41690-41700, 2017.
46. RUDZIŃSKA, M. et al. The role of cysteine cathepsins in cancer progression and drug resistance. *Int J Mol Sci*, v.20, n.14, p.3602, 2019.
47. GUINEC, N.; DALET-FUMERON, V.; PAGANO, M. "In vitro" study of basement membrane degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B, B-like and L. Digestion of collagen IV, laminin, fibronectin, and release of gelatinase activities from basement membrane fibronectin. *Biol Chem Hoppe Seyler*, v.374, n.12, p.1135-1146, 1993.
48. JOYCE, J. A. et al. Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer Cell*, v.5, n.5, p.443-453, 2004.
49. SEVENICH, L. et al. Transgenic expression of human cathepsin B promotes progression and metastasis of polyoma-middle-T-induced breast cancer in mice. *Oncogene*, v.30, n.1, p.54-64, 2011.
50. SOBOTIC, B. et al. Proteomic identification of cysteine cathepsin substrates shed from the surface of cancer cells. *Mol Cell Proteom*, v.14, n.8, p.2213-2228, 2015.
51. COSTA, A. C. et al. Cathepsin S as a target in gastric cancer. *Mol Clin Oncol*, v.12, n.2, p.99-103, 2020.
52. KHAN, A. et al. Cathepsin B expression and its correlation with tumor-associated laminin and tumor progression in gastric cancer. *Arch Pathol Lab Med*, v.122, n.2, p.172-177, 1998.
53. PALERMO, C.; JOYCE JA. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends Pharmacol Sci*, v.29, n.1, p.22-28, 2008.
54. CHWIERALSKI, C.; WELTE, T.; BÜHLING, F. Cathepsin-regulation apoptosis. *Apoptose*, v.11, n.2, p.143-149, 2006.

55. TAN, G. J. et al. Cathepsins mediate tumor metastasis. *World J Biol Chem*, v.4, n.4, p.91-101, 2013.
56. ZHANG, L.; WANG, H.; XU, J. Cathepsin S as a cancer target. *Neoplasma*, v.62, n.1, p.16-26, 2015.
57. MCDOWELL, S. H. et al. Leading the invasion: The role of Cathepsin S in the tumor microambient. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, v.1867, n.10, p.118781, 2020.
58. DHEILLY, E. et al. Cathepsin S regulates antigen processing and T cell activity in non-hodgkin lymphoma. *Cancer Cell*, v.37, n.5, p.674-689, 2020.
59. CAMPO, E. et al. Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival. *Am J Pathol*, v.145, n.2, p.301-309, 1994.
60. SCORILAS, A. et al. Determination of cathepsin B expression may offer additional prognostic information for ovarian cancer patients. *Biol Chem*, v.383, n.7-8, p.1297-1303, 2002.
61. XU, L. et al. Expression status of cathepsin B may as a prognostic marker for human gastric carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, v.9, n.7, p.6988-6998, 2016.
62. EBERT, M. P. et al. Overexpression of cathepsin B in gastric cancer identified by proteome analysis. *Proteomics*, v.5, n.6, p.1693-1704, 2005.
63. ATWA, H. A.; ARAFA, S. A. Significance of TGF- β 1 and Cathepsin E expression in gastric adenocarcinoma and precancerous lesions. *J Am Sci*, v.12, n.1, p.59-67, 2016.
64. KONNO-SHIMIZU, M. et al. Cathepsin E is a marker of gastric differentiation and signet-ring cell carcinoma of stomach: a novel suggestion on gastric tumorigenesis. *PLoS ONE*, v.8, n.2, p.e56766, 2013.
65. KRUEGER, S. et al. Up-regulation of cathepsin X in Helicobacter pylori gastritis and gastric cancer. *J Pathol*, v.207, n.1, p.32-42, 2005.
66. YANG, H. et al. The potential role of Cathepsin K in non-small cell lung cancer. *Molecules*, v.25, n.18, p.4136, 2020.
67. YU, S. et al. FOXO3a promotes gastric cancer cell migration and invasion through the induction of cathepsin L. *Oncotarget*. 2016;7(23):34773-84.
68. BURDEN, R. E. et al. Antibody-mediated inhibition of cathepsin S blocks colorectal tumor invasion and angiogenesis. *Clin Cancer Res*, v.15, n.19, p.6042-6051, 2009.

69. BURDEN, R. E. et al. Inhibition of Cathepsin S by Fsn0503 enhances the efficacy of chemotherapy in colorectal carcinomas. *Biochimie*, v.94, n.2, p.487-493, 2012.
70. YAN, Y. et al. Clinical significance of serum cathepsin B and cystatin C levels and their ratio in the prognosis of patients with esophageal cancer. *Onco Targets Ther*, v.10, n.1, p.1947-1954, 2017.
71. SHREE, T. et al. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev*, v.25, n.23, p.2465-2479, 2011.
72. BRUCHARD, M. et al. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat Med*, v.19, n.1, p.57-64, 2013.
73. REMPEL, S. A. et al. Cathepsin B expression and localization in glioma progression and invasion. *Cancer Res*, v.54, n.3, p.6027-6031, 1994.
74. Fernández, P. L. et al. Expression of cathepsins B and S in the progression of carcinoma prostate. *Int J Cancer*, v.95, n.1, p.51-55, 2001.
75. KUESTER, D. et al. The cathepsin family and their role in colorectal cancer. *Pathol Res Pract*, v.204, n.7, p.491-500, 2008.
76. CRUZ-MONSERRATE, Z. et al. Detection of pancreatic cancer tumours and precursor lesions by cathepsin E activity in mouse models. *Gut*, v.61, n.9, p.1315-1322, 2012.
77. TRIPATHI, R.; PLATTNER, R. EnABLING Cathepsin-Driven Melanoma Metastasis. *Mol Cell Oncol*, v.5, n.4, p.e1458016, 2018.
78. WILKINSON, R. D. A. et al. A novel role for cathepsin s as a potential biomarker in triple negative breast cancer. *J Oncol*, v.1, n.6, p.1-12, 2019.

**APÊNDICE A - VERSÃO DO ARTIGO ORIGINAL A SER PUBLICADO NA
REVISTA GASTRIC CANCER, APÓS CORREÇÕES DA BANCA EXAMINADORA**

ORIGINAL ARTICLE

**Analysis of the expression of cathepsin S in gastric adenocarcinoma and in
Helicobacter pylori infection**

Adriano C. Costa¹, Fernando Santa-Cruz², Raphael L. C. Araújo³, José-Luiz Figueiredo⁴,
Álvaro A. B. Ferraz⁴

¹Oncology Unit, Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco (HC-UFPE), Recife, PE, Brazil

²Medical School, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

³Department of Digestive Surgery, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brazil

⁴Department of Surgery, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Disclosure: Authors have nothing to disclose.

Funding: The authors declare no financial support.

Authors' e-mails: adrianocacosta@gmail.com; f.santacruzoliveira@gmail.com;
raphael.araujo@unifesp.br; joseluiz.figueiredo@gmail.com; alvaroabferraz@gmail.com

Correspondence to:

Adriano C. Costa (adrianocacosta@gmail.com);

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária;

Recife – PE;

ZIP: 50670-901

Running head: Cathepsin S and gastric cancer

Word count:

Abstract (250): Background, methods, results, conclusion

Keywords: Gastric cancer; Cathepsin S; Cathepsins; Biomarkers; Early diagnosis.

Mini-abstract (30):

Introdução

As catepsinas são enzimas que compreendem uma família de 15 proteases lisossomais, amplamente distribuídas nos espaços intracelulares e extracelulares, entre as quais 5 foram repetidamente implicadas na progressão de cânceres sólidos (catepsinas B, H, K, L e S) [1,2].

As catepsinas participam de uma ampla gama de atividades do organismo com base em seu efeito de hidrólise. Em cânceres digestivos, a expressão das catepsinas é regulada positivamente por fatores promotores de tumor, como C-myc, K-ras, AGR2, MAPK, p38 e as vias de sinalização Hedgehog (Hh). As catepsinas ativadas hidrolisam fatores de crescimento, como EGF, VEGF e TGF β , promovendo a proliferação de células cancerosas e parecem desempenhar um papel, ainda incerto, na regulação da apoptose [3,4]. Além disso, análises da expressão das catepsinas em microambientes tumorais têm suscitado a discussão acerca do papel dessas moléculas na resposta à terapia anti-câncer e no fenômeno de resistência terapêutica [5].

Recentemente, estudos tem apontado para uma suposta relação entre o câncer gástrico e a expressão de catepsinas, especificamente a catepsina S (CTTS), com dados ainda incipientes sugerindo um potencial terapêutico, prognóstico e diagnóstico desta enzima na evolução da doença [6]. Estudos *in vitro* mostraram que expressões aumentadas de CTTS estão relacionadas com maior invasão tumoral e metástases, e que a sua inibição é capaz de impedir a invasão e a migração de células tumorais no câncer gástrico [1, 2]. Paralelamente a isso, pesquisadores também evidenciaram que a expressão sérica da CTTS pode servir como um grande aliado no diagnóstico precoce do câncer gástrico, apresentando, inclusive, uma sensibilidade superior aos marcadores tumorais habituais, como CEA, CA 19.9 e CA 72.4 [2].

O presente estudo objetivou avaliar a expressão da CTTS em amostras de tecido gástrico de pacientes com adenocarcinoma gástrico e comparar com a expressão em amostras de tecido gástrico de pacientes sem câncer, com gastrite apenas. Além disso, buscou-se avaliar o impacto da infecção por *H. pylori* na expressão da CTTS nas amostras de tecido gástrico sem câncer.

Métodos

Desenho do estudo

Estudo transversal realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, que buscou avaliar a expressão de CTTS em amostras de tecido gástrico de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico (n=42) e de pacientes com diagnóstico de gastrite apenas (n=50). O grupo de pacientes com gastrite foi subdividido em outros 2 subgrupos: com pesquisa positiva para *H. pylori* (n=25) e com pesquisa negativa para *H. pylori* (n=25). O desfecho primário foi comparar a expressão da CTTS avaliada através de imunohistoquímica em amostras de tecido gástrico de pacientes com adenocarcinoma e de pacientes com gastrite (com e sem *H. pylori*). This research protocol was approved by the Ethics Committee of our institution under the protocol CAAE 38000620.9.0000.8807.

Seleção de pacientes

Foram incluídos os pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico do adenocarcinoma gástrico com intenção curativa em nosso centro no período de 2017 a 2019. Pacientes com estadiamento IV e aqueles submetidos à quimioterapia neoadjuvante foram excluídos da análise. Após cada procedimento cirúrgico para tratamento de adenocarcinoma gástrico, foi selecionado sempre o primeiro paciente a apresentar um resultado histopatológico confirmatório para gastrite no setor de Patologia de nossa instituição, objetivando formar o grupo controle com o menor risco possível de viés de seleção. Neste grupo, foram incluídos os pacientes submetidos à esofagogastroduodenoscopia (EGD) com biopsia das lesões confirmando tratar-se de gastrite. A pesquisa de *H. pylori* foi realizada em todos os pacientes

através do teste da Urease e confirmada pelo histopatológico com a coloração Giemsa. Pacientes previamente submetidos à gastroplastia e aqueles com relato de tratamento prévio para *H. pylori* foram excluídos da análise.

Imunohistoquímica

A coloração imunohistoquímica (IHC) foi realizada para estudar a expressão de CTSS em 42 amostras de tecido de câncer gástrico humano e em 50 amostras de tecido gástrico com gastrite. Cortes em série foram cortados a 3 µm para imunohistoquímica e colocados em lâminas de vidro Superfrost Plus. A imunocoloração foi realizada com um anticorpo policlonal de coelho dirigido contra a catepsina X com diluição de 1:120 (CTSS distribuído pela ABclonal, Massachusetts, Estados Unidos). A interpretação das reações imunohistoquímicas foram realizadas em microscópio óptico comum e foram analisadas de acordo com o padrão específico para cada anticorpo pesquisado. A intensidade de marcação foi avaliada, utilizando-se a seguinte graduação:

Graduação	Marcação
0	sem coloração detectável
1	coloração fraca = amarelo claro
2	coloração moderada = amarelo marrom
3	coloração forte = marrom

A porcentagem de células tumorais coradas foi graduada da seguinte forma:

Graduação	Intensidade
0	nenhuma célula tumoral positiva
1	1-25% de células tumorais positivas
2	26-50% células tumorais positivas
3	51-75% de células tumorais positivas
4	> 75% de células tumorais positivas

A pontuação referente ao índice de coloração foi calculada como o produto da porcentagem de células tumorais positivas com o grau de intensidade da marcação. A expressão da CTTS foi definida de acordo com o índice de coloração:

Expressão	Coloração
-	pontuação 0: negativo
+	pontuação 1-4: fracamente positivo
++	pontuação 5-8: positiva
+++	pontuação 9-12: fortemente positivo

Para fins de análise, a intensidade de expressão da CTTS foi avaliada de forma categórica: expressão alta ou expressão baixa. Expressão alta foi definida como uma pontuação no índice de coloração > 4 , enquanto que a expressão baixa foi definida como uma pontuação ≤ 4 . Um índice = 0 corresponde à expressão ausente.

Análise estatística

Para as análises estatística foram utilizados os Softwares STATA/SE 12.0 e o Excel 2010; Valores médios e desvios padrão foram calculados para descrever a população de dados. Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança, e um valor $p < 0,05$ foi considerado

significativo em todos os testes. Os resultados estão apresentados em forma de tabela com suas respectivas frequências absoluta e relativa; a existência de associação foi verificada usando o teste Qui-Quadrado e o teste Exato de Fisher para as variáveis categóricas. O poder estatístico desta amostra foi de 72,7% de acordo com a presença ou ausência de CTTS nos grupos de câncer gástrico comparados com lesões benignas do estômago.

Resultados

Noventa e dois pacientes foram estudados, dos quais 50 pacientes apresentavam gastrite e 42 pacientes apresentavam adenocarcinoma gástrico. Nos pacientes portadores de gastrite, a idade variou de 18 a 78 anos. Dentre eles, 35 pacientes (70%) tinham menos que 50 anos, 17 (34%) eram do sexo masculino e 33 (66%) do sexo feminino. Nos pacientes portadores de CG, a idade variou de 37 a 85 anos. Dentre eles, 34 pacientes (81%) tinham mais que 50 anos, 21 (50%) eram do sexo masculino e 21 (50%) do sexo feminino.

Em relação à topografia do tumor, 23 pacientes apresentavam tumores no antro (54,8%) e 19 no corpo gástrico (45,2%). Gastrectomia subtotal foi realizada em 20 pacientes (47,6%), e gastrectomia total em 22 pacientes (52,4%). Quanto ao estadiamento patológico, 10 pacientes foram classificados como estágio IA (23,8%), 10 como estágio IB (23,8%), 19 como estágio IIIB (45,3%), e 3 pacientes como estágio IIIC (7,1%). Em relação tipo histológico, 18 foram classificados como intestinal (42,9%), 18 como difuso (42,9%), e 6 como tumores mistos (14,2%). Detectou-se embolização vascular linfática de células neoplásicas em 23 casos (54,8,7%), estando ausente em 19 casos (45,2%). Ocorreram recidiva em 23,8% dos casos. A situação desses pacientes no final do estudo foi: vivo sem doença (71,4%), vivo com doença (7,1%), óbito por outras causas (4,8%), óbito por câncer (16,7%). A Tabela 1 mostra as frequências das variáveis clínicas, estadiamento, terapêutica e seguimento, entre os 42 pacientes com CG deste estudo.

Tabela 1 Caracterização do grupo de pacientes com câncer gástrico.

Variáveis	Grupo câncer gástrico	
	n	%
Topografia		
Antro	23	54,8
Corpo	19	45,2
Tipo de cirurgia		
Gastrectomia subtotal	20	47,6
Gastrectomia total	22	52,4
Estágio patológico		
IA	10	23,8
IB	10	23,8
IIIB	19	45,3
IIIC	03	7,1
Tumor primário		
T1	10	23,8
T2	10	23,8
T3	19	45,3
T4	03	7,1
Linfonodos		
N0	20	47,6
N3	22	52,4
Tipo histológico		
Intestinal	18	42,9
Difuso	18	42,9
Misto	06	14,2
Grau histológico		
Bem diferenciado	03	7,1
Moderadamente	08	19,0
Pouco diferenciado	31	73,9
Invasão angiolinfática		
Positivo	23	54,8
Negativo	19	45,2

Recidiva

Sem recidiva	32	76,2
Com recidiva	10	23,8

Status atual

Vivo sem doença	30	71,4
Vivo com doença	03	7,1
Óbito sem câncer	02	4,8
Óbito com câncer	07	16,7

Ao comparar a expressão de CTTS entre os dois grupos, é possível observar que nas amostras de gastrite, 38% não expressaram CTTS, 46% apresentam baixa expressão (1-25%), e apenas 16% apresentaram expressão maior que 25%. Por outro lado, entre os pacientes com adenocarcinoma gástrico, 19% apresentaram expressão entre 25-50%, 14,3 % entre 51-75%, e 26,2% apresentam expressão maior que 75%, com resultados estatisticamente significativos ($p < 0,001$). As análises envolvendo a pontuação da coloração de CTTS na IHC e a intensidade de expressão também apresentaram significância estatística, sendo maiores no grupo de pacientes com adenocarcinoma gástrico (Tabela 2).

Table 2 Comparação entre os grupos câncer gástrico x gastrite

Variáveis	Grupos				p-valor*
	Câncer gástrico		Gastrite		
	n	%	n	%	
Idade					
Abaixo de 50 anos	8	19,0	35	70,0	<0,001
Acima de 50 anos	34	81,0	15	30,0	
Sexo					
Masculino	21	50,0	17	34,0	0,121
Feminino	21	50,0	33	66,0	
<i>H. pylori</i>					
Positivo	8	19,0	24	48,0	0,004
Negativo	34	81,0	26	52,0	
Porcentagem de expressão de Catepsina S					
Sem células positivas	07	16,7	19	38,0	<0,001
1-25%	10	23,8	23	46,0	
25-50%	08	19,0	04	8,0	
51-75%	06	14,3	02	4,0	
>75%	11	26,2	02	4,0	
Expressão da Catepsina S					
Negativo (0)	7	16,7	19	38,0	0,002
Fragamente positiva (1-4)	14	33,3	24	48,0	
Positivo (5-8)	09	21,4	03	6,0	
Fortemente positivo (9-12)	12	28,6	04	8,0	
Intensidade de expressão					
Ausência – 0	7	16,7	19	38,0	0,001
Baixa < 4	14	33,3	24	48,0	
Alta ≥ 4	21	50,0	07	14,0	

(*) Teste Qui-Quadrado

Na avaliação da expressão da CTTS no grupo de pacientes com gastrite, foi possível observar que a expressão da CTTS foi significativamente maior nos pacientes com pesquisa positiva para *H. pylori*, 87,5% x 38,5% ($p < 0,001$).

Tabela 3 Expressão da CTTS no grupo de pacientes com gastrite.

Variáveis	Expressao de Catepsina S				p-valor*
	Positivo		Negativo		
	n	%	n	%	
Idade					
Abaixo de 50 anos	22	62,9	13	37,1	0,849
Acima de 50 anos	09	60,0	06	40,0	
Sexo					
Masculino	11	64,7	06	35,3	0,777
Feminino	20	60,6	13	39,4	
<i>H. pylori</i>					
Positivo	21	87,5	03	12,5	<0,001
Negativo	10	38,5	16	61,5	

(*) Teste Qui-Quadrado

Na avaliação da expressão de CTTS no grupo de pacientes com adenocarcinoma gástrico, não foi possível observar nenhuma associação estatisticamente significante entre a positividade da expressão e as variáveis clínico-patológicas estudadas.

Discussion

As catepsinas que já demonstraram aumento de expressão na vigência de câncer gástrico foram a B, E, K, L, S, X e Z. Até o momento, existem apenas poucos estudos que buscaram avaliar a relação da CTTS com o câncer gástrico [1, 2, 7]. Essa enzima parece ter um papel

importante no processo de invasão tumoral através da degradação da matriz extracelular, modulação da resposta imune e regulação de diversas vias de sinalização celular, incluindo a ativação de receptores tirosino-quinase, especialmente o c-Met, metaloproteinases da matriz, IL-11, CXCL16, Integrina α -6- β -4 [1, 4, 8]. Ainda, especificamente para o adenocarcinoma gástrico, a CTTS parece ter um efeito ativador sobre as cancer cell lines MKN7 e MKN45 [1].

Liu et al., avaliaram a dosagem sérica da CTTS em pacientes portadores de câncer gástrico comparando os resultados com pacientes saudáveis e com lesões gástricas benignas [2]. Observaram que os valores séricos de CTTS dos pacientes com câncer gástrico foram significativamente maiores do que os dos controles de tecido gástrico não tumoral ($P < 0.001$). Ainda neste estudo, os autores investigaram o poder diagnóstico da CTTS em sua amostra com 496 pacientes, encontrando valores de sensibilidade e especificidade de 60,7% e 90%, respectivamente. Adicionalmente, observou-se, neste estudo, uma diminuição significativa nos níveis séricos de CTTS após a ressecção cirúrgica do tumor, sugerindo uma íntima relação desta enzima com o microambiente tumoral. No nosso estudo, encontramos resultados similares, com a expressão de CTTS sendo significativamente maior no grupo de pacientes com adenocarcinoma gástrico em relação aos controles. Os resultados desses estudos sugerem que a CTTS pode ser um potencial biomarcador para o diagnóstico de câncer gástrico.

Yang et al. estudaram a expressão das catepsinas em laboratório através quantificação proteicas em culturas de células normais e células de câncer gástrico. Os níveis de expressão das catepsina S e B encontrados foram significativamente diferentes entre células normais e cancerosas [1]. Observou-se uma maior expressão proteica e uma regulação positiva da catepsina S e B, em contraste, as catepsinas L e B foram reguladas negativamente no secretoma do câncer gástrico neste estudo. Um experimento adicional através da coloração Imunohistoquímica foi realizado para estudar e validar a regulação positiva focado

especificamente na catepsina S nas células cancerosas gástricas, um número significativo de tipos de câncer gástrico intestinal, difuso e misto expressou catepsina S em níveis mais elevados do que os tecidos normais ($p < 0,01$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão de CTSS entre os subtipos de câncer gástrico.

Pesquisadores demonstraram correlação entre a CTTS e as características da doença, como tamanho do tumor, invasão linfonodal, metástases à distância e sobrevida global; observando que expressões mais elevadas de CTTS estavam relacionadas estágios TNM mais avançados e pior sobrevida [9]. No presente estudo não se observou associação estatisticamente significativa entre expressão de CTTS e o estadiamento do tumor ou sobrevida. Uma possível explicação para essa diferença observada entre os estudos é o número de pacientes incluídos, que foi notadamente menor em nossa análise.

A infecção da mucosa gástrica por *H. pylori* é sabidamente um importante fator de risco para o desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico, contudo, os mecanismos exatos de ativação da carcinogênese ainda não estão totalmente elucidados [10]. Um dos possíveis mecanismos apontados nesse processo é a resposta pró-inflamatória orquestradas pelas células Th17 na mucosa gástrica infectada [11, 12]. Estudos anteriores mostraram associação entre a infecção por *H. pylori* e níveis aumentados de expressão das catepsinas D e X, contudo, nenhum estudo até aqui foi realizado buscando determinar o comportamento da CTTS na vigência de infecção por *H. pylori* [13, 14]. No presente estudo, avaliamos a expressão da CTTS em amostras de mucosa gástrica infectada por *H. pylori*. Foi observado que 87,5% das amostras no grupo gastrite com *H. pylori* apresentaram expressão positiva para CTTS, contrastando com apenas 12,5% do grupo gastrite sem *H. pylori*. Esses resultados reforçam a hipótese de que a CTTS está envolvida no processo de carcinogênese do adenocarcinoma gástrico, uma vez que também tem sua expressão aumentada

O estudo apresenta algumas limitações que merecem atenção. Primeiramente, em relação ao tamanho da amostra que, em consequência do caráter unicêntrico do estudo, acabou sendo limitado, com um poder amostral de 72,7%. Como a amostra foi não probabilística, selecionada por conveniência, não foi realizado o cálculo do tamanho amostral uma vez que todos os pacientes operados no período de estudo foram incluídos na análise. Outra limitação que vale ser mencionada é em relação à natureza observacional e transversal deste estudo. Uma análise longitudinal poderia trazer informações mais acuradas acerca da relação da expressão da CTTS com a sobrevida dos pacientes. Contudo, para o nosso desfecho primário, a metodologia aplicada se mostrou adequada.

Em contraste às limitações acima discutidas, o presente estudo traz dados importantes que dão robustez e autenticidade à análise apresentada. Trata-se de um dos poucos trabalhos a estudar a expressão da CTTS em amostras de adenocarcinoma gástrico em seres humanos e o primeiro a atestar uma possível relação entre a expressão desta enzima com a infecção por *H. pylori*, um importante fator de risco para o desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico.

Conclusion

Levando-se em consideração os resultados do presente estudo, os autores podem concluir que a CTTS tem sua expressão aumentada em amostras de adenocarcinoma gástrico em comparação com amostras de tecido não tumoral. Além disso, como achado secundário, foi observado que pacientes com gastrite por *H. pylori* também apresentaram maior expressão da CTTS quando comparados com pacientes com gastrite com pesquisa negativa para esta bactéria. Esses resultados reforçam a discussão acerca do papel da CTTS na evolução do câncer gástrico, contudo, mais estudos ainda se fazem necessários, objetivando definir, de fato, a relação desta enzima no processo de carcinogênese do adenocarcinoma gástrico.

Acknowledgements

The authors expressed their appreciation to the Centro de Diagnóstico Anatomopatológico (CEDAP), João Pessoa, PB, Brazil

Funding

The authors declare no financial support.

Conflict of interest

All of the authors have declared no competing interest.

References

1. Yang Y, Lim SK, Choong LY, Lee H, Chen Y, Chong PK, Ashktorab H, Wang TT, Salto-Tellez M, Yeoh KG, Lim YP. Cathepsin S mediates gastric cancer cell migration and invasion via a putative network of metastasis-associated proteins. *J Proteome Res.* 2010;9(9):4767-78.
2. Liu WL, Liu D, Cheng K, Liu YJ, Xing S, Chi PD, et al. Evaluating the diagnostic and prognostic value of circulating cathepsin S in gastric cancer. *Oncotarget.* 2016;7(19):28124-38.
3. Khan A, Krishna M, Baker SP, Malhotra R, Banner BF. Cathepsin B expression and its correlation with tumor-associated laminin and tumor progression in gastric cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 1998;122(2):172-77.
4. Wilkinson RDA, Williams R, Scott CJ, Burden RE, Williams, R. Cathepsin S. Therapeutic, diagnostic, and prognostic potential. *Biol Chem.* 2015;396(8):867-82.
5. Olson O, Joyce J. Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(12):712-29.
6. Costa AC, Santa-Cruz F, Mattos LAR, Rêgo Aquino MA, Martins CR, Bandeira Ferraz AA. et al. Cathepsin S as a target in gastric cancer. *Mol Clin Oncol.* 2020;12(2):99-103.

7. Yang H, Heyer J, Zhao H, Liang S, Guo R, Zhong L. The potential role of Cathepsin K in non-small cell lung cancer. *Molecules*. 2020;25(18):4136.
8. Zhang Y, Xia M, Jin K, et al. Function of the c-Met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities. *Mol Cancer*. 2018;17(1):45.
9. Pinheiro DR, Ferreira WA, Barros MB, Araújo MD, Rodrigues-Antunes S, Borges BN. Perspectives on new biomarkers in gastric cancer: diagnostic and prognostic applications. *World J Gastroenterol*. 2014;20(33):11574-85.
10. Ahn HJ, Lee DS. *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis. *World J Gastrointest Oncol*. 2015;7(12):455-465.
11. Amedei A, Munari F, Bella CD, Niccolai E, Benagiano M, Bencini L, et al. *Helicobacter pylori* secreted peptidyl prolyl cis, trans-isomerase drives Th17 inflammation in gastric adenocarcinoma. *Intern Emerg Med*. 2014;9(3):303–9.
12. Dixon BREA, Hossain R, Patel RV, Algood HMS. Th17 Cells in *Helicobacter pylori* Infection: a Dichotomy of Help and Harm. *Infect Immun*. 2019;87(11):e00363-19.
13. Krueger S, Kalinski T, Hundertmark T, Wex T, Küster D, Peitz U, Ebert M, Nägler DK, Kellner U, Malfertheiner P, Naumann M, Röcken C, Roessner A. Up-regulation of cathepsin X in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *J Pathol*. 2005;207(1):32-42
14. Plebani M, Basso D, Rugge M, Vianello F, Di Mario F. Influence of *Helicobacter pylori* on tryptase and cathepsin D in peptic ulcer. *Dig Dis Sci*. 1995;40(11):2473-6.

APÊNDICE B – REGISTRO DE CÂNCER GÁSTRICO DOS PACIENTES DO ESTUDO

RGH	Número
Número do AP	
Idade	
Valor da Idade	(0) Abaixo de 50 anos (1) Acima de 50 anos
Sexo	(0) Masculino (2) Feminino
Topografia	(0) Antro (1) Corpo
Tipo de Cirurgia	(0) Gastrectomia subtotal (1) Gastrectomia subtotal
Data de Cirurgia	
Estádio Patológico	(0) I A (1) I B (2) II A (3) II B (4) III A (5) III B (6) III C
Pesquisa de H Pylori com Giemsa	(0) Negativo (1) Positivo
Tumor Primário	(0) T1 (1) T2 (2) T3 (3) T4
Linfonodos	(0) N0 (1) N1 (2) N2 (3) N3
Tipo Histológico	(0) Intestinal (1) Difuso (2) Misto (3) Indeterminado
Grau histológico	(0) Bem diferenciado (1) Moderadamente (2) Pouco diferenciado
Invasão angiolinfática	(0) Positivo (1) Negativa
Intensidade de marcação de Catepsina S	(0) Sem coloração detectável (1) Coloração fraca= amarelo claro (2) Coloração moderada= amarelo marrom (3) Coloração forte= marrom

Porcentagem de expressão de Catepsina S	(0) Sem células positivas (1) 1-25 % (2) 25 -50% (3) 51-75 % (4) >75%
Pontuação de coloração	(0) Negativo (0) (1) Fracamente positivo (1-4) (2) Positivo (5-8) (3) Fortemente positivo (9-12)
Tipo de expressão	(0) Ausência de Expressão - 0 (1) Baixa expressão < 4 (2) Alta expressão >= 4
Status atual	(0) Vivo sem doença (1) Vivo com doença (2) Óbito sem câncer (3) Óbito com câncer
Data do Óbito	
Data da última informação	

APÊNDICE C – REGISTRO DE BIÓPSIAS ENDOSCÓPICAS DOS PACIENTES DO ESTUDO

RGH	Número
Número do AP	
Idade	
Valor da Idade	(0) Abaixo de 50 anos (1) Acima de 50 anos
Sexo	(0) Masculino (2) Feminino
Teste da Urease	(0) Negativo (1) Positivo
Pesquisa de H Pylori com Giemsa	(0) Negativo (1) Positivo
Data da colheita da amostra Amostra	
Intensidade de marcação de Catepsina S	(0) Sem coloração detectável (1) Coloração fraca= amarelo claro (2) Coloração moderada= amarelo marrom (3) Coloração forte= marrom
Porcentagem de expressão de Catepsina S	(0) Sem células positivas (1) 1-25 % (2) 25 -50% (3) 51-75 % (4) >75%
Pontuação de coloração de catepsina S	(0) Negativo (0) (1) Fracamente positivo (1-4) (2) Positivo (5-8) (3) Fortemente positivo (9-12)
Tipo de expressão	(0) Ausência de Expressão - 0 (1) Baixa expressão < 4 (2) Alta expressão >= 4



ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM HUMANOS

UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -
HC/UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CATEPSINA S NOS TUMORES GÁSTRICOS E SUA CORRELAÇÃO COM INFECÇÃO POR HELICOBACTER PYLORI.

Pesquisador: Adriano Carneiro da Costa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 38000620.9.0000.8807

Instituição Proponente: EMPRESA BRASILEIRA DE SERVICOS HOSPITALARES - EBSEH

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.491.158

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do projeto", "Objetivo da Pesquisa", Avaliação dos riscos e benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básica da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1602925.pdf de 15/09/2020) e/ou do Projeto Detalhado (PROJETODETALHADO.pdf de 04/09/2020).

O projeto intitulado "ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CATEPSINA S NOS TUMORES GÁSTRICOS E SUA CORRELAÇÃO COM INFECÇÃO POR HELICOBACTER PYLORI" tem como pesquisador principal Adriano Carneiro da Costa cujo a pesquisa refere-se a um Doutorado do Programa de Pós- Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina do Recife, Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco com os Orientadores Prof. Dr. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz e Coorientador Prof. Dr. José Luiz Figueiredo. O mesmo apresenta a justificativa de desenvolver novas modalidades de tratamento para paciente portadores de câncer gástrico, envolvendo o biomarcador Catepsina S, que é de grande interesse para a comunidade médica, tendo em vista a alta incidência desse tipo de tumor, e ressaltando-se um papel importante da catepsina S no crescimento e na progressão de tumores, destacando essa protease como um possível alvo para o tratamento do câncer.

UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -
HC/UFPE



Continuação do Parecer: 4.491.158

Outros	z.pdf	13:56:36	da Costa	Acelto
Outros	curriculoAdrianoCameirodaCosta.pdf	04/09/2020 13:55:38	Adriano Carneiro da Costa	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 06 de Janeiro de 2021

Assinado por:

Paulo Roberto Cavalcanti Carvalho
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-901

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-3743

E-mail: cephoufpe@gmail.com

ANEXO B – VERSÃO DO ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO NA REVISTA MOLECULAR AND CLINICAL ONCOLOGY

MOLECULAR AND CLINICAL ONCOLOGY

Cathepsin S as a target in gastric cancer (Review)

ADRIANO CARNEIRO DA COSTA¹, FERNANDO SANTA-CRUZ²,
LUIZ ALBERTO REIS MATTOS JR¹, MARIA AMÉLIA RÊGO AQUINO², CAMILA RAMOS MARTINS³,
ÁLVARO ANTÔNIO BANDEIRA FERRAZ⁴ and JOSÉ LUIZ FIGUEIREDO⁴

¹Unidade de Oncologia, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco;

²Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco; ³Curso de Medicina,

Centro Universitário de João Pessoa; ⁴Departamento de Cirurgia, Universidade

Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brazil

Received May 7, 2019; Accepted September 19, 2019

DOI: 10.3892/mco.2019.1958

Abstract. Cathepsin S (Cat S) is a protein expressed in some epithelial cells, which appears to be associated with cancer metastasis and recurrence. The abnormal expression of Cat S has been reported to be associated with the progression of certain types of gastrointestinal neoplasms, including gastric cancer (GC). There is a need to identify novel biomarkers and therapeutic targets associated with the growth, invasion and migration of GC cells, in order to develop non-invasive diagnostic and prognostic procedures and design new therapeutic approaches. The aim of the present study was to assess the association between Cat S and oncogenic processes implicated in the development of GC, focusing on the diagnostic and therapeutic potential of this molecule in GC. A search was conducted through the PubMed and Cochrane Central Register of Controlled Trials electronic databases for relevant literature published between 2003 and 2018, using the mesh terms 'cathepsin S' and 'cancer' and 'gastric cancer'.

Contents

1. Introduction
2. Gastric cancer
3. Cathepsin S and carcinogenesis

Correspondence to: Dr Adriano Carneiro da Costa, Unidade de Oncologia, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, 1235 Av. Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil
E-mail: adrianocosta@gmail.com

Dr Fernando Santa-Cruz, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco, 1235 Av. Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil
E-mail: f.santacruzoliveira@gmail.com

Key words: cathepsin S, gastric cancer, carcinogenesis, tumor, biomarkers, metastasis

4. Cathepsin S and gastric cancer
5. Conclusion

1. Introduction

Proteases represent approximately 2.8% of the proteins expressed by the human genome. They are commonly involved in degradation pathways eliminating unwanted and defective proteins. Researchers have been studying the effects of proteases on cancer development, aiming to develop new anticancer therapies (1-3). Proteases are a large group of enzymes that catalyze the cleavage of peptide bonds. Cathepsin S (Cat S) is a cysteine protease found more frequently in lysosomes of hematopoietic cells, but it may also be segregated in the extracellular environment (4-7).

Studies have demonstrated that the inhibition of Cat S results not only in attenuation of angiogenesis, but also in increased apoptosis and reduction of tumor volume and invasion. These effects indicate a potential relevant role for Cat S in tumor growth and progression, and this molecule may be a possible target for cancer treatment (3,4,8).

The literature on the association between Cat S and gastrointestinal neoplasms is scarce, with even fewer studies assessing specifically its association with GC. The aim of the present study was to review the currently available information regarding Cat S and the occurrence and progression of GC, with the purpose of developing future perspectives for using Cat S as a possible therapeutic target for this malignancy.

2. Gastric cancer

GC is the fifth most frequently diagnosed cancer and the third leading cause of cancer-related mortality worldwide (9). The incidence of GC varies according to different geographic regions. Approximately 60% of gastric neoplasms occur in developing countries. The highest incidence is observed in Eastern Asia, Eastern Europe and the Andean region of South America, whereas the lowest rates are encountered in North America, Northern Europe, Southeast Asia and the majority of African countries (10,11).

Statistical data have been demonstrating a declining incidence of GC, particularly in USA, England, and other developed countries (11). However, an increasing incidence is observed in patients <30 years of age, with the possible implication of different molecules, pathways and epigenetic mechanisms (12).

The GC-related mortality rates are considerably high worldwide, with a mean 5-year survival rate of 21% in Europe and 18% in the USA. The highest rates are reported in Osaka, Japan, with a mean 5-year survival rate of 47% (10).

The majority of GCs occur sporadically due to complex interactions between environmental and ethnic factors. However, approximately 1-3% display an inherited familial component. Patients with germline mutations in tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome), breast cancer 2 gene and cadherin-1, in particular, are at an increased risk of developing GC (13).

Infection by *H. pylori* is considered the most important risk factor for the development of GC, particularly gastric adenocarcinoma (14). Although it is clear that *H. pylori* is the most frequent predisposing agent for GC, the precise molecular mechanisms underlying the development of this neoplasm in reaction to *H. pylori* infection have not been clearly determined. However, the increased cellular replication and the constant attraction of polymorphonuclear leukocytes are well known events that appear to exert carcinogenic effects (15,16). Amedei *et al.* (17) reported that the secreted peptidyl prolyl cis, trans-isomerase of *H. pylori* is able to drive gastric Th17 response in patients with distal GC. Therefore, they inferred that *H. pylori* may be linked to GC through the pro-inflammatory low cytotoxic response, matrix degradation and pro-angiogenic pathways (17).

Several oncogenes, tumor suppressor genes and metastasis-related genes have been implicated in GC (18). Some of the dysregulated genes in GC, including p53, Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog, transforming growth factor receptor-2 and catenin β -1, may be implicated in the development of a wide variety of other tumors. Other genes, such as fibroblast growth factor receptor-2 and MET proto-oncogene, are more specific to GC. Among the mutated genes or those with increased expression in GC, some, such as human epidermal growth factor receptor-2 (*HER2/NEU*), cyclooxygenase-2 (*COX2*) and epidermal growth factor receptor (*EGFR*), have been investigated as possible targets for GC therapy (19,20). It has been demonstrated that trastuzumab, an inhibitor of *HER2/NEU*, can affect the growth of *HER2/NEU*-overexpressing GC cells (21). GC with *COX2* overexpression has been associated with lymphatic metastasis, and the use of *COX2*-specific inhibitors, such as celecoxib, are under investigation as a possible intervention for advanced disease (19). Regarding *EGFR*, it has been observed that increased expression of this receptor is associated with worse prognosis in GC. Its selective inhibition by gefitinib has shown promising results for metastatic disease (22).

3. Cathepsin S and carcinogenesis

During the development and progression of tumors, one of the most important events is local invasion, which is mediated by the degradation of the extracellular matrix (ECM), and the

proteases involved in this process are being increasingly identified (23). Invasive tumor cells and their microenvironment are enriched with a wide range of proteases (4).

New therapeutic strategies and biomarkers have been identified for the treatment and diagnosis of malignant tumors. Among these, a group of proteases, the lysosomal cysteine cathepsins (e.g., Cat S), appear to be of extreme relevance. The inhibition of Cat S using a selective monoclonal antibody (Fsn0503) has been shown to be beneficial, acting against colorectal, prostatic and breast carcinoma invasion, and it has also achieved attenuation of angiogenesis in several types of tumors (24). The *in vivo* inhibition of Cat S by Fsn0503 has also achieved a significant decrease in colorectal tumor growth in murine models, not only as an isolated agent (24), but also in combination with chemotherapy (25,26).

The involvement of Cat S in carcinogenesis appears to be related to apoptosis, autophagy, angiogenesis, and cell migration and invasion.

Apoptosis. Lysosomes are essential organelles in the process of apoptosis, and cathepsins are important executors of lysosome-mediated apoptosis. Cat S assists with the essential mediation of apoptotic signaling to release cathepsins to the cytosol. Apoptosis induced by Cat S occurs through different apoptotic pathways, including the intrinsic pathway (mitochondrial death) and the extrinsic pathway (death receptor). The former is controlled by members of the B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) family, such as Bcl-2 and Bcl-2-associated death promoter. In the latter, death receptors on the plasma membrane activate the tumor necrosis factor receptor 1 and Fas/CD95. However, the specific molecular mechanisms implicated in lung cancer, GC and prostate cancer are unclear (27,28).

Autophagy. Cat S is associated with autophagy in cancer cells. This may be explained by the association between lysosomes and Cat S. Targeting Cat S may induce autophagy in cancer cells, such as nasopharyngeal cancer, colon adenocarcinoma, oral-epidermoid carcinoma, alveolar basal epithelial and human squamous carcinoma cells. Therefore, the inhibition and induction of autophagy mediated by Cat S is not cell-specific, and targeting Cat S may induce autophagy in GC (27,29).

Angiogenesis. It has been observed that Cat S plays an important role in angiogenesis, which is a crucial part of tumor development and a fundamental step in the transition of tumors from a benign to a malignant state (27).

In an experiment on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), it was observed that the vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulated HUVEC capillary tube formation, whereas the addition of three specific Cat S inhibitors suppresses the proteolytic activity of Cat S, resulting in significant reduction of VEGF-induced capillary-like tube development (30).

In another experiment, suppressed VEGF secretion and restrained HUVEC tube formation in human hepatocellular carcinoma was achieved through targeting Cat S by small interfering RNA (28). However, the precise molecular mechanisms through which Cat S interferes with angiogenesis remain elusive (27).

Invasion and migration. Cat S is of paramount importance in cell migration and invasion. It has been observed that silencing Cat S by specific siRNAs leads to inhibition of GC cell invasion (31). The same was observed for other cancer cells, such as hepatocellular carcinoma, lung adenocarcinoma, and skin melanoma cells. Therefore, Cat S may be an important factor for containing malignant cell invasion and migration (27,28).

The expression of Cat S was found to be increased in several types of cancer, including GC. One of its main sources are tumor-associated macrophages (27,32). Therefore, Cat S may be of value not only as a therapeutic target, but also as a prognostic marker, as it is closely associated with the occurrence of metastasis (3,32).

4. Cathepsin S and gastric cancer

The results previously reported in the literature regarding the inhibition of Cat S in different gastrointestinal neoplasms are summarized in Table I. The data on the experimental use of Cat S inhibitors and its outcomes, either *in vivo* or *in vitro*, for gastrointestinal cancer development are summarized. Of note, only a few studies have assessed the role of this molecule in gastrointestinal cancers, and even fewer in GC, which is the main objective of the present study.

Regarding the occurrence of GC, Cat S is associated with one of the hallmarks of tumor development, namely local invasion. This process occurs due to the fact that Cat S is able to degrade the ECM, modulate inflammation and the immune response, as well as regulate other carcinogenic factors (27,33).

Cat S acts as a regulator of signaling pathways including: i) Tyrosine kinase receptors, such as c-Met and AXL (33). Cat S may be necessary for the proteolytic maturation and secretion of c-Met into the extracellular compartment of GC cells; ii) peptidases, including members of the cathepsin family (e.g., Cat D), matrix metallopeptidases and kallikrein families (33). Cat D and matrix metallopeptidases are associated with cancer metastasis and recurrence (33), and they have the ability to digest the ECM that otherwise impedes cancer cell invasion; iii) chemokines/cytokines, such as IL-11 and CXCL16. CXCL16 is a molecule essential for the development of peritoneal carcinomatosis in GC (33), whereas IL-11 is required for GC development; iv) Cytoskeletal proteins and adhesion molecules, such as cortactin (CTTN) and integrins, respectively (33). CTTN and integrin $\alpha 6 \beta 4$ play important roles in cell-cell and focal adhesion, thereby affecting cell migration (33). The inhibition of Cat S leads to diminished expression of these molecules; v) proteins from *HFE145*, *MKN7* and *MKN45* (33). When compared with normal cells, Cat S expression is increased in the GC cells MKN7 and MKN45 (33).

The members of the cysteine cathepsin family displaying increased expression in GC are Cat B, E, K, L, S, X and Z. Cat S is the only one among the cysteine cathepsins the expression of which is associated with antigen-presenting cells. Therefore, as regards protein processing in the extracellular microenvironment, Cat S is of higher physiological importance compared with the remaining family members (34-36).

Invasive methods, such as endoscopy and biopsy, are used for GC diagnosis. Certain tumor markers may also prove useful in the diagnosis and follow-up of this disease,

Table I. Cathepsin S as an inhibitor of gastrointestinal malignant neoplasms.

Tumor site	Testing	Role	Cell line	Results of cathepsin S inhibitors	Author (Refs)
Colorectal	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Increased expression, associated with tumor growth and invasion	Fsn0503h, MC38	Cytotoxic effect (antibody-dependent cytotoxicity) in 22% of the tumor cells, in addition to the inhibition of invasion and angiogenesis	Wilkinson <i>et al</i> (7) Burden <i>et al</i> (25) Burden <i>et al</i> (26) Kwok <i>et al</i> (32) Small <i>et al</i> (30)
Pancreatic	<i>In vivo, in vitro</i>	Increased expression, associated with tumor growth	RIP1-Tag2	Inhibition of tumor growth and angiogenesis	Wang <i>et al</i> (37)
Hepatocellular	<i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	Induced apoptosis Increased expression, associated with growth, invasion and metastasis	MHCC97-H	CTSS silencing with lentivirus-mediated RNAi can induce significant apoptosis and chemosensitivity in MHCC97-H cells	Lee <i>et al</i> (38) Wang <i>et al</i> (39)
Gastric	<i>In vitro</i>	Increased expression, associated with tumor invasion and metastasis	MFEN45 and MKN7	CTSS inhibitors may be able to impede invasion and migration of gastric cancer cells	Yang <i>et al</i> (33) Liu <i>et al</i> (31)

CTSS, cathepsin S.

4

DA COSTA *et al.* CATHEPSIN S AS A TARGET IN GASTRIC CANCER

such as carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen (CA) 72-4 and CA 19-9. However, their sensitivity is not sufficient to enable diagnosis at the early stages (31). Therefore, there is a pressing need for biomarkers with higher specificity and sensitivity to enable early, non-invasive diagnosis, and to monitor the progression of GC (3).

The diagnostic value of serum Cat S has been found to have a specificity similar to the conventionally used markers CEA, CA 72-4 and CA 19-9, but with a higher sensitivity. The combination of serum Cat S and these traditional markers has demonstrated the best results, with specificity and sensitivity of 91.2 and 72.6%, respectively (31).

5. Conclusion

As regards the occurrence of GC, increased expression of Cat S, which is a member of a large group of extracellular proteases, was observed; in addition, the inhibition of Cat S was shown to suppress migration and invasion of gastric neoplastic cells. Therefore, it may be inferred that Cat S may hold promise as a biomarker for the diagnosis and prognosis of GC, in addition to being a possible therapeutic target to control disease progression.

However, due to the scarcity of the currently available literature on the association between Cat S and GC, more studies, particularly clinical trials and prospective studies, are required to provide more solid data and elucidate the true value of Cat S, not only as a diagnostic and prognostic marker, but also as an effective therapeutic target, in the hope of achieving better disease control and improving the life quality and survival rate of GC patients.

Acknowledgements

Not applicable.

Funding

No funding was received.

Availability of data and materials

Not applicable.

Authors' contributions

ACDC, AABF and JLF were involved in the initial design of the study and conception of the project. FSC, LARM, MARA and CRM helped with the literature research and the writing of the manuscript. ACDC and AABF helped draft the manuscript. AABF and JLF supervised the study. FSC, LARM, JLF were responsible for the final revision. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Patient consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

- López-Otín C and Matrisian LM: Emerging roles of proteases in tumor suppression. *Nat Rev Cancer* 7: 800-808, 2007.
- Rawlings ND, Barrett AJ and Bateman A: MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 40 (Database Issue): D343-D350, 2012.
- Tan GJ, Peng ZK, Lu JP and Tang FQ: Cathepsins mediate tumor metastasis. *World J Biol Chem* 4: 91-101, 2013.
- Gocheva V, Zeng W, Ke D, Klimstra D, Reinheckel T, Peters C, Hanahan D and Joyce JA: Distinct roles for cysteine cathepsins in multistage tumorigenesis. *Genes Dev* 20: 543-556, 2006.
- Turk B, Turk D and Turk V: Protease signalling: The cutting edge. *EMBO J* 31: 1630-1643, 2012.
- Repnik U, Starr AE, Overall CM and Turk B: Cysteine cathepsins activate ELR chemokines and inactivate non-ELR chemokines. *J Biol Chem* 290: 13800-13811, 2015.
- Wilkinson RD, Magorrian SM, Williams R, Young A, Small DM, Scott CJ and Burden RE: CCL2 is transcriptionally controlled by the lysosomal protease cathepsin S in a CD74 dependent manner. *Oncotarget* 6: 29725-29739, 2015.
- Joyce JA, Baruch A, Chehade K, Meyer-Morse N, Giraudo E, Tsai FY, Greenbaum DC, Hager JH, Bogoy M and Hanahan D: Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer Cell* 5: 443-453, 2004.
- National Comprehensive Cancer Network: Gastric cancer. NCCN clinical practice guidelines in oncology. Version 2.2018, May 22, 2018.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J and Pisani P: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74-108, 2005.
- Crew KD and Neugut AI: Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 12: 354-362, 2006.
- Mohanty S and Panda KS: Gastric cancer in young patients under the age of 35 years: A hospital-based study. *Int Surg J* 3: 1933-1936, 2016.
- Egger ME, Ikoma N and Badgwell BD: Primary gastric malignancies. In: Feig BW and Ching CD (eds). *The MD Anderson Surgical Oncology Handbook*. 6th edition. Philadelphia. Womers Kluwer, pp379-431, 2019.
- Ahn HJ and Lee DS: *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis. *World J Gastrointest Oncol* 7: 455-465, 2015.
- Hartgerink HH, Jansen EP, van Grieken NC and van de Velde CJ: Gastric cancer. *Lancet* 374: 477-490, 2009.
- Bae JM and Kim EH: *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer in Korea: A quantitative systematic review. *J Prev Med Public Health* 49: 197-204, 2016.
- Amedei A, Munari F, Bella CD, Niccolai E, Benagiano M, Bencini L, Cianchi F, Farsi M, Emmi G, Zanotti G, *et al.*: *Helicobacter pylori* secreted peptidyl prolyl cis, trans-isomerase drives Th17 inflammation in gastric adenocarcinoma. *Intern Emerg Med* 9: 303-309, 2014.
- Carneiro F, Machado JC, David L, Reis C, Nogueira AM and Sobrinho-Simões M: Current thoughts on the histopathogenesis of gastric cancer. *Eur J Cancer Prev* 10: 101-102, 2001.
- Scartozzi M, Galizia E, Freddari F, Berardi R, Cellerino R and Cascinu S: Molecular biology of sporadic gastric cancer: Prognostic indicators and novel therapeutic approaches. *Cancer Treat Rev* 30: 451-459, 2004.
- Lynch HT, Grady W, Suriano G and Huntsman D: Gastric cancer: New genetic developments. *J Surg Oncol* 90: 114-133, 2005.
- Kono K, Takahashi A, Ichihara F, Sugai H, Fujii H and Matsumoto Y: Impaired antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by herceptin in patients with gastric cancer. *Cancer Res* 62: 5813-5817, 2002.
- Doi T, Koizumi W, Siena S, Cascinu S, Ohtsu A and Michael M: Efficacy, tolerability and pharmacokinetics of gefitinib (ZD1839) in pretreated patients with metastatic gastric cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22: Abstr 1036, 2003.
- Shi GP, Sukhova GK, Kuzuya M, Ye Q, Du J, Zhang Y, Pan JH, Lu ML, Cheng XW, Iguchi A, *et al.*: Deficiency of the cysteine protease cathepsin S impairs microvessel growth. *Circ Res* 92: 493-500, 2003.

24. Vázquez R, Astorgues-Xerri L, Bekradda M, Gormley J, Buick R, Kerr P, Cvitkovic E, Raymond E, D'Incalci M, Frapolli R and Riveiro ME: Fsn0503h antibody-mediated blockade of cathepsin S as a potential therapeutic strategy for the treatment of solid tumors. *Biochimie* 108: 101-107, 2015.
25. Burden RE, Gormley JA, Jaquin TJ, Small DM, Quinn DJ, Hegarty SM, Ward C, Walker B, Johnston JA, Olwill SA and Scott CJ: Antibody-mediated inhibition of cathepsin S blocks colorectal tumor invasion and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 15: 6042-6051, 2009.
26. Burden RE, Gormley JA, Kuehn D, Ward C, Kwok HF, Gazdoin M, McClurg A, Jaquin TJ, Johnston JA, Scott CJ and Olwill SA: Inhibition of cathepsin S by Fsn0503 enhances the efficacy of chemotherapy in colorectal carcinomas. *Biochemie* 94: 487-493, 2012.
27. Zhang L, Wang H and Xu J: Cathepsin S as a cancer target. *Neoplasma* 62: 16-26, 2015.
28. Sevenich L, Bowman RL, Mason SD, Quail DF, Rapaport F, Elie BT, Brogi E, Brastianos PK, Hahn WC, Holsinger LJ, et al: Analysis of tumour- and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S. *Nat Cell Biol* 16: 876-888, 2014.
29. Huang CC, Chen KL, Cheung CHA and Chang JY: Autophagy induced by cathepsin S inhibition induces early ROS production, oxidative DNA damage, and cell death via xanthine oxidase. *Free Radic Biol Med* 65: 1473-1486, 2013.
30. Small DM, Burden RE, Jaworski J, Hegarty SM, Spence S, Burrows JF, McFarlane C, Kissenpfennig A, McCarthy HO, Johnston JA, et al: Cathepsin S from both tumor and tumor-associated cells promote cancer growth and neovascularization. *Int J Cancer* 133: 2102-2112, 2013.
31. Liu WL, Liu D, Cheng K, Liu YJ, Xing S, Chi PD, Liu XH, Xue N, Lai YZ, Guo L and Zhang G: Evaluating the diagnostic and prognostic value of circulating cathepsin S in gastric cancer. *Oncotarget* 7: 28124-28138, 2016.
32. Kwok HF, Buick RJ, Kuehn D, Gormley JA, Doherty D, Jaquin TJ, McClurg A, Ward C, Byrne T, Jaworski J, et al: Antibody targeting of Cathepsin S induces antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Mol Cancer* 10: 147, 2011.
33. Yang Y, Lim SK, Choong LY, Lee H, Chen Y, Chong PK, Ashktorab H, Wang TT, Salto-Tellez M, Yeoh KG and Lim YP: Cathepsin S mediates gastric cancer cell migration and invasion via a putative network of metastasis-associated proteins. *J Proteome Res* 9: 4767-4778, 2010.
34. Turk V, Turk B and Turk D: Lysosomal cysteine proteases: Facts and opportunities. *EMBO J* 20: 4629-4633, 2001.
35. Jordans S, Jenko-Kokalj S, Kuhl NM, Tedelind S, Sendt W, Bromme D, Turk D and Brix K: Monitoring compartment-specific substrate cleavage by cathepsins B, K, L, and S at physiological pH and redox conditions. *BMC Biochem* 10: 23, 2009.
36. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B and Turk D: Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta* 1824: 68-88, 2012.
37. Wang B, Sun J, Kitamoto S, Yang M, Grubb A, Chapman HA, Kalluri R and Shi GP: Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J Biol Chem* 281: 6020-6029, 2006.
38. Lee TK, Cheung VC, Lu P, Lau EY, Ma S, Tang KH, Tong M, Lo J and Ng IO: Blockade of CD47-mediated cathepsin S/protease-activated receptor 2 signaling provides a therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 60:179-191, 2014.
39. Wang X, Xiong L, Yu G, Li D, Peng T, Luo D and Xu J: Cathepsin S silencing induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *Am J Transl Res* 19: 100-110, 2015.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) License.